

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

**CONSTRUÇÃO DE MUTANTE DE SUPEREXPRESSÃO PARA AVALIAÇÃO
FUNCIONAL DO GENE CNBG4278 DE *Cryptococcus gattii***

Trabalho de Conclusão de Curso

CAROLINA BETTKER VASCONCELOS

Porto Alegre, Junho de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**CONSTRUÇÃO DE MUTANTE DE SUPEREXPRESSÃO PARA AVALIAÇÃO
FUNCIONAL DO GENE CNBG4278 DE *Cryptococcus gattii***

CAROLINA BETTKER VASCONCELOS

Trabalho apresentado como um dos requisitos para
obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia,
ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientadora: Livia Kmetzsch Rosa e Silva

Co-orientadora: Júlia Catarina Vieira Reuwsaat

Porto Alegre, Junho de 2016.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Livia Kmetzsch, que foi muito atenciosa nos momentos em que precisei de auxílio durante este trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, oportunidade e confiança;

À minha co-orientadora Júlia Reuwsaat, que sempre esteve disposta a ajudar e ensinar da melhor maneira possível. Obrigada pela amizade, confiança, paciência e dedicação;

Ao professor Charley Staats, pela disponibilidade e atenção;

À professora Marilene Vainstein pela confiança;

Ao Heryk, pela ajuda e companheirismo;

À Ane, companheira de experimentos e de risadas. Obrigada pelo apoio, ajuda e amizade;

Aos demais colegas dos laboratórios 220 e 217 do Centro de Biotecnologia por toda a ajuda e por tornarem meus dias mais alegres;

À minha mãe, que fez o possível para que esta etapa fosse vencida com tranquilidade. Obrigada pelo apoio constante e amor incondicional.

Ao Gabriel, pelo carinho e compreensão.

À minha família, amigos e todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho;

À UFRGS e aos professores, pelo ensino de excelência;

Às agências de fomento que possibilitaram a realização deste trabalho.

RESUMO

As leveduras encapsuladas *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* são os principais agentes etiológicos da criptococose. Estimativas apontam um milhão de casos anuais de infecção por *Cryptococcus* no mundo, gerando 620 mil mortes anualmente. A infecção é causada principalmente por *C. neoformans*, atingindo preferencialmente pacientes imunocomprometidos. No entanto, também há incidência marcante em pacientes imunocompetentes, principalmente pela infecção de *C. gattii*. Devido à alta toxicidade dos atuais tratamentos antifúngicos ao hospedeiro e ao aumento do número de cepas resistentes, estudos que visam gerar inovações na área de imunoterapia para o tratamento da criptococose são de grande relevância. As manoproteínas correspondem a aproximadamente 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus* e são extremamente imunogênicas. Considerando que estas proteínas são capazes de induzir resposta imune mediada por células T, sua utilização no desenvolvimento de novas terapias contra a criptococose é promissora. No entanto, ainda não existem relatos da caracterização de manoproteínas de *C. gattii*. Este fato, aliado ao aumento da expressão do gene CNBG4278, o qual codifica uma manoproteína, em situações de interação com o hospedeiro, sugere que este gene pode ser um interessante alvo de estudo. Sendo assim, este trabalho objetivou construir linhagens de superexpressão deste gene para sua caracterização funcional. Para tanto, foi realizada a construção de mutantes de superexpressão de CNBG4278 em um mutante nulo para este gene. Três linhagens foram selecionadas (*cnbg4278Δ-P_{H3}CNMG4278* 19, 39 e 62) e submetidas a testes fenotípicos, juntamente com as linhagens mutante *cnbg4278Δ* e complementada *cnbg4278Δ::CNMG4278*. Os resultados demonstraram que CNBG4278 não interfere nos mecanismos de termotolerância ou tolerância a estresse osmótico. No entanto, sua deleção causou danos que levaram à manifestação de um fenótipo mucoide da colônia, o qual não foi revertido em duas linhagens de superexpressão *cnbg4278Δ-P_{H3}CNMG4278* 19 e 62. Os danos causados podem estar relacionados a estabilidade da parede celular, já que estas linhagens são hipersensíveis a *Congo Red* (400 mg/mL). Os resultados também demonstraram que as linhagens estudadas apresentam um padrão diferenciado de produção de melanina. A síntese de cápsula polissacarídica e atividade de fosfolipase não foram alteradas. No ensaio de sobrevivência em macrófagos, os transformantes de superexpressão apresentaram níveis de sobrevivência similares ao da linhagem selvagem R265. Desta forma, conclui-se que a proteína codificada pelo gene CNBG4278 pode estar envolvida na estrutura da parede celular, podendo influenciar a expressão de fatores de virulência em *C. gattii*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS/SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida
APC	células apresentadoras de antígeno
BCS	ácido dissulfônico batocuproína
BSA	soro albumina bovina
CD4+	linfócito T helper
CD8+	linfócito T citotóxico
cDNA	DNA complementar
CFU	unidades formadoras de colônia
DC	diâmetros da colônia
DCP	diâmetro da colônia e sua zona de precipitação
DEPC	pirocarbonato de dietila
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FBS	soro fetal bovino
G418	gentamicina
GalXM	galactoxilomanana
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GXM	glucuronoxilomanana
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ	interferon gama
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-17	interleucina 17
IL-17A	interleucina 17A
IL-2	interleucina 2
IL-21	interleucina 21
IL-22	interleucina 22

IL-23	interleucina 23
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
kDa	kilo Dalton
L-DOPA	ácido (2S)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)-propanóico
LB	<i>Luria Broth</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
OD	densidade óptica
ORF	fase aberta de leitura
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
Pz	atividade de fosfolipase
RNA	ácido ribonucleico
RPK	<i>reads</i> por kilobase
RPKM	<i>reads</i> por kilobase por milhão
RPM	rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real associado a transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGF- β	fator de necrose tumoral beta
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-piridil-metil)etilenodiamino
YPD	<i>yeast-extract/peptone/dextrose</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Especiação de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i> e seus diferentes sorotipos e genótipos.	2
Figura 2. Ilustração esquemática do processo de infecção por <i>C. gattii</i> (esquerda) e <i>C. neoformans</i> (direita).	4
Figura 3. Níveis relativos de transcritos que codificam CNBG4278 em condições de interação com o hospedeiro e na privação de micronutrientes.	11
Figura 4. Fragmento de 2,4 kb gerado por PCR <i>Double Joint</i> e mapa do plasmídeo pJAF1.	22
Figura 5. Confirmação da construção de pJAF1_CNBG4278.	23
Figura 6. Níveis relativos de mRNA de CNBG4278 em mutantes de superexpressão obtidos por análise em <i>Real Time</i> RT-qPCR.	24
Figura 7. RT-PCR confirmatório.	25
Figura 8. Níveis relativos de mRNA de CNBG4278 obtidos por <i>Real Time</i> RT-qPCR.	25
Figura 9. Análise de sensibilidade térmica a 30 e 37 °C dos mutantes de CNBG4278.	26
Figura 10. Análise de sensibilidade a estresse osmótico com CaCl ₂ 1,5 M e NaCl 1,5 M.	27
Figura 11. Análise da integridade da parede celular de mutantes de CNBG4278.	28
Figura 12. Ensaio de melanização em meio líquido.	29
Figura 13. Pigmentação celular após indução de síntese de melanina.	30
Figura 14. Indução de cápsula das linhagens R265 e mutantes de CNBG4278.	31
Figura 15. Tamanho relativo da cápsula celular após indução de 48 h.	31
Figura 16. Avaliação da atividade de fosfolipase.	33
Figura 17. Ensaio de avaliação da atividade de urease.	34
Figura 18. Ensaio de sobrevivência em macrófagos J774.A1 das linhagens R265 e mutantes para o gene CNBG4278.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados neste trabalho.	21
Tabela 2. Análise da atividade enzimática de fosfolipase nas linhagens R265, <i>cnbg4278Δ</i> , <i>cnbg4278Δ::CNBG4278</i> , <i>cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278</i> 19, 38 e 62.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Cryptococcus gattii</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	1
1.2 Criptococose	2
1.3 Fatores de virulência	4
1.3.1 Termotolerância	5
1.3.2 Cápsula polissacarídica	5
1.3.3 Produção de melanina	6
1.3.4 Urease	6
1.3.5 Fosfolipase	6
1.4 Resposta imune do hospedeiro.....	7
1.5 Manoproteínas.....	9
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo Geral.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Linhagens celulares, plasmídeos, meios de cultura e oligonucleotídeos	14
4.2 Construção dos mutantes de superexpressão do gene CNBG4278	14
4.3 Clivagens e enzimas de restrição	15
4.4 Extração de DNA genômico e plasmidial.....	15
4.5 Extração de RNA	16
4.6 RT-PCR e <i>Real Time</i> RT-qPCR	17
4.7 Ensaio de caracterização fenotípica	18
4.7.1 Avaliação do crescimento a 30 e 37 °C e testes de sensibilidade a estressores osmóticos e de parede celular	18
4.7.2 Avaliação da síntese de melanina	18
4.7.3 Indução de cápsula.....	18
4.7.4 Avaliação da atividade de fosfolipase.....	19
4.7.5 Avaliação da atividade de urease	20

4.8 Ensaio de fagocitose em macrófagos murinos J774.A1	20
5. RESULTADOS	22
5.1 Construção do cassete de superexpressão	22
5.2 Obtenção e confirmação de mutantes cnbg4278Δ-P _{H3} CN BG4278	23
5.3 Testes Fenotípicos	26
5.3.1 Crescimento a 30 e 37 °C	26
5.3.2 Estresse osmótico e iônico	26
5.3.3 Integridade da parede celular	27
5.3.4 Síntese de melanina	28
5.3.5 Produção de cápsula	30
5.3.6 Atividade de fosfolipase	32
5.3.7 Atividade de urease	33
5.4 Fagocitose em macrófagos murinos J774.A1	34
6. DISCUSSÃO	36
7. PERSPECTIVAS	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cryptococcus gattii e Cryptococcus neoformans

A criptococose em humanos é uma doença predominantemente causada pelas leveduras basidiomicéticas *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (Bahn 2014). Estas espécies apresentam cerca de 85-90% de similaridade genética. Portanto, ambas diferem em suas características moleculares, epidemiológicas, distribuição geográfica e nichos ecológicos (Cogliati 2013). Inicialmente, a espécie *C. neoformans* era classificada em 4 sorotipos (A - D) de acordo com as características e diferenças nos antígenos capsulares (Franzot et al. 1999). No entanto, com os avanços nas caracterizações moleculares, os sorotipos B e C passaram a ser classificados como uma nova espécie, denominada *C. gattii* (Kwon-Chung & Varma 2006). Estima-se que *C. neoformans* e *C. gattii* divergiram a cerca de 18,5 e 37 milhões de anos, respectivamente, de um ancestral comum (Lin & Heitman 2006).

Atualmente, *C. gattii* é subdividido nos sorotipos B e C. O sorotipo B é composto pelos tipos moleculares VGI e VGII, os quais são associados à infecção em indivíduos imunocompetentes (Byrnes et al. 2011). Já o sorotipo C, que infecta principalmente pacientes imunocomprometidos, consiste nos tipos moleculares VGIII e VGIV (Lin & Heitman 2006). O genótipo VGII é dividido nos subgenótipos VGIIa, VGIIb e VGIIc, que variam em seus níveis de virulência. VGIIa e VGIIc são considerados hipervirulentos em relação a VGIIb (Byrnes et al. 2010). Inicialmente, acreditava-se que a distribuição geográfica de *C. gattii* estava restrita a regiões tropicais (Kwon-Chung & Bennett 1984). Entretanto, em 1999 ocorreu um surto de criptococose causada por *C. gattii* em Vancouver, no Canadá, o qual se espalhou rapidamente para outras regiões do noroeste da América do Norte, infectando tanto pessoas imunocompetentes quanto animais (MacDougall et al. 2007). Cerca de 97% dos casos de criptococose do surto de Vancouver eram do tipo molecular VGII, o qual provavelmente se originou na floresta Amazônica e se disseminou para o noroeste da América do Norte (Kidd et al. 2004; Hagen et al. 2013). Após este acontecimento, admitiu-se que *C. gattii* também pode se desenvolver em regiões temperadas. Atualmente, há um número reduzido de casos de infecção na região do Noroeste Pacífico. No entanto, tem sido observado um aumento na variedade de linhagens de *C. gattii* e na incidência em outras regiões, como Europa, leste dos Estados Unidos e China (Harris et al. 2013; Fang et al. 2015; Perfect & Bicanic 2015).

Diferentemente de *C. gattii*, *C. neoformans* apresenta distribuição mundial e está dividido nos sorotipos A (*C. neoformans* var. *grubii*), D (*C. neoformans* var. *neoformans*) e o híbrido AD. O sorotipo A é constituído pelos tipos moleculares VNI, VNII e VNB, o sorotipo D pelo tipo molecular VNIV e o sorotipo híbrido AD é constituído pelo tipo molecular VNIII (Lin & Heitman 2006) (Figura 1).

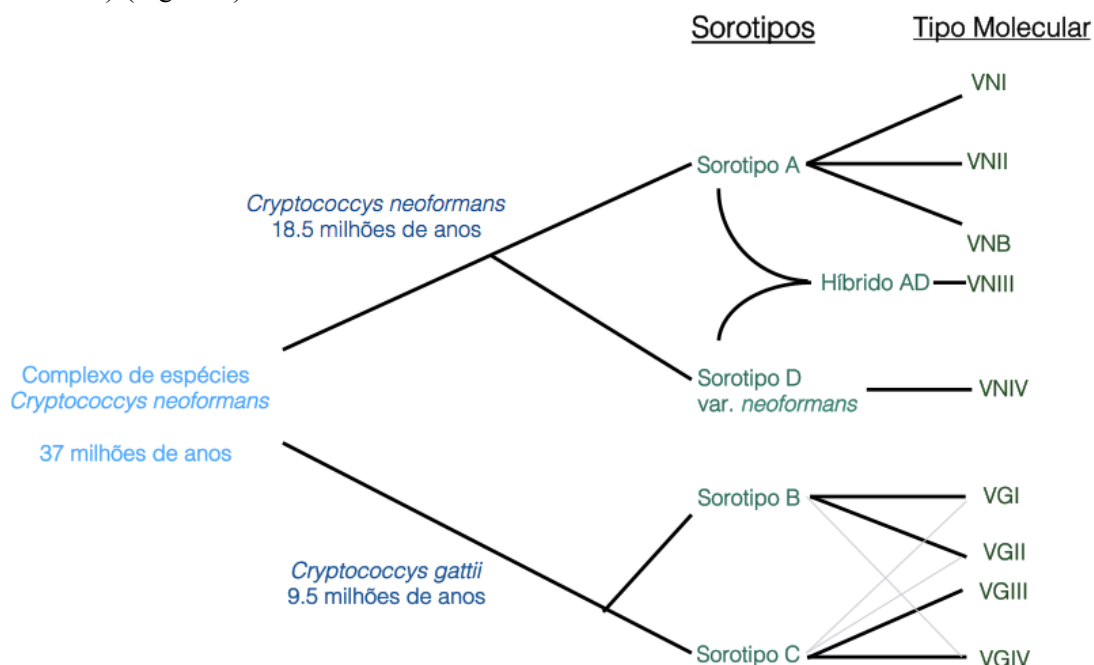


Figura 1. Especiação de *C. neoformans* e *C. gattii* e seus diferentes sorotipos e genótipos. Estima-se que *C. neoformans* e *C. gattii* tenham divergido há 37 e 18,5 milhões de anos, respectivamente. Existem três diferentes sorotipos de *C. neoformans*: A (genótipos VNI, VNII e VNB), D (genótipo VNIV) e o híbrido AD (genótipo VNIII). São conhecidos dois sorotipos de *C. gattii*: B (genótipos VGI, VGII) e C (genótipos VGIII e VGIV). Adaptado de Lin e Heitman (2006).

1.2 Criptococose

A criptococose é caracterizada por infecção pulmonar e, eventualmente, disseminação do agente etiológico para o sistema nervoso central (SNC), onde pode causar meningite e levar a quadros graves da doença. A infecção causada por *C. neoformans* é responsável por cerca de 95% dos casos de criptococose no mundo (Lin 2009). Esta doença acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), transplantados, pacientes tratados com imunossupressores ou portadores do vírus da hepatite B ou C (Bratton et al. 2012). No entanto, há também incidência marcante em

pacientes imunocompetentes, principalmente pela ação de *C. gattii* (Pappas & Birmingham 2013).

Em 2009, estimativas apontavam cerca de 1 milhão de casos de infecção por *C. neoformans* em pacientes com AIDS por ano, levando 62,5% destes indivíduos a óbito (Park et al. 2009). No entanto, na 9ª Conferência em *Cryptococcus* e Criptococose (ICCC), a qual ocorreu em Amsterdam, Holanda, em 2014, foi anunciada uma estimativa revisada e reduzida do número de mortes causadas devido a complicações decorrentes da criptococose (Idnurm and Lin 2015). Esta redução deve-se, principalmente, ao desenvolvimento de tratamentos antirretrovirais. Entretanto, apesar da existência de tratamentos eficazes, indivíduos com AIDS continuam sendo um grupo bastante suscetível ao desenvolvimento da infecção (Bratton et al. 2012). Além disso, muitos países têm acesso limitado a estas novas terapias. No continente africano, por exemplo, cerca de 30-60% dos casos de meningite são decorrentes de infecção por *Cryptococcus* sp., sendo que as taxas de mortalidade devido a criptococose chegam a 75% (Veltman et al. 2014; Idnurm and Lin 2015). Na América Latina, a meningoencefalite é a forma clínica mais comum da criptococose, com cerca de 85% dos casos causados por infecção com *C. neoformans* (Olivares et al. 2009), sendo 80% deles em pacientes portadores de HIV (da Cunha Colombo et al. 2011; Sifuentes-Osornio et al. 2012). No Brasil, *C. neoformans* é o maior causador de micose sistêmica em pacientes com AIDS, levando até 51% destes indivíduos a óbito (Prado et al. 2009). No Rio Grande do Sul, dados de 2007 a dezembro de 2013 demonstraram que aproximadamente 20% dos pacientes notificados com meningite criptocócica foram a óbito devido a complicações da doença (Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul, 2013).

A infecção por *Cryptococcus* sp. se inicia a partir da inalação de esporos ou leveduras dessecadas presentes no ambiente (Lin & Heitman 2006; Velagapudi et al. 2009). Árvores de eucalipto (*Eucalyptus calmadulensis*) e madeiras em decomposição são as principais fontes ambientais de *C. gattii* (Ma & May 2009; Hagen & Boekhout 2010), enquanto que *C. neoformans* está geralmente associado ao solo e excretas de aves, principalmente pombos (*Columba livia*) (Nielsen et al. 2007) (Figura 2). Após a deposição das células fúngicas no pulmão, ocorre a interação com os macrófagos alveolares, sendo este o primeiro contato com o sistema imune do hospedeiro (Gibson & Johnston 2014). Após a fagocitose das leveduras, elas podem ser eliminadas através da apresentação de antígenos às células T, podem entrar em um estado de latência ou estabelecer uma infecção pulmonar (McQuiston & Williamson 2012). Quando o mecanismo de defesa do hospedeiro encontra-se debilitado, células fagocíticas podem se tornar um nicho para a replicação fúngica. Neste caso, ocorre a disseminação por via hematogênica, o que pode causar infecção sistêmica no hospedeiro (Liu et al. 2012). Em modelo murino de infecção, observa-se que *C. gattii* tende a ficar mais restrito a infecções pulmonares; já

C. neoformans apresenta tropismo acentuado para o SNC (Ngamskulrungrroj et al. 2012). De acordo com estudos *in vitro*, esta tendência se deve a maior facilidade de transmigração de células de *C. neoformans* pela barreira hemato-encefálica, através do mecanismo conhecido como “Cavalo de Troia”, o qual consiste no transporte mediado por macrófagos (Sorrell et al. 2016). Além disso, a transmigração também pode ocorrer por transcitose direta, processo no qual as células fúngicas sofrem alterações morfológicas para interagir com as células endoteliais (Chang et al. 2004; Liu et al. 2012).

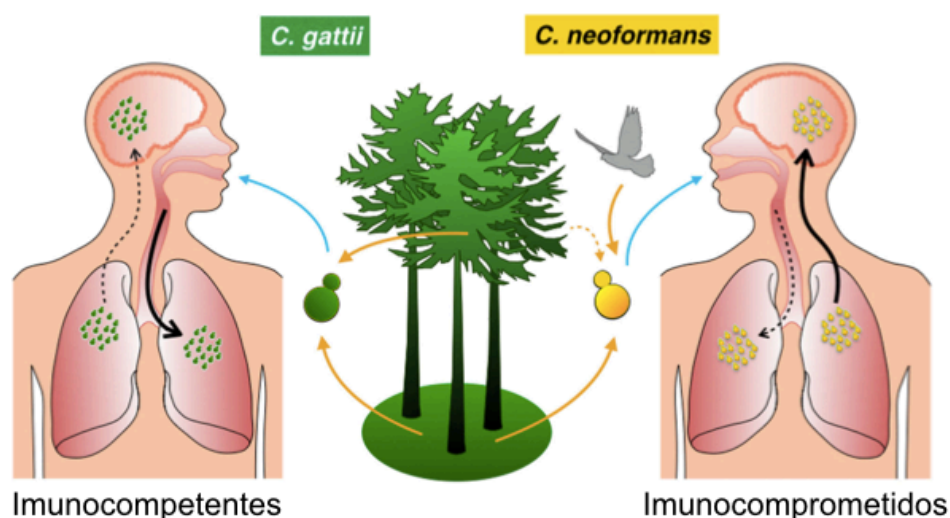


Figura 2. Ilustração esquemática do processo de infecção por *C. gattii* (esquerda) e *C. neoformans* (direita). A infecção se inicia pela inalação de esporos ou leveduras dessecadas provenientes de fontes ambientais, sendo *C. gattii* normalmente associado a árvores de eucalipto e *C. neoformans* à excreta de pombos. Após a inalação, as leveduras se depositam no pulmão, havendo tropismo acentuado de *C. neoformans* para o SNC, enquanto *C. gattii* tende a ficar mais restrito aos pulmões. A condição imunológica do hospedeiro mais frequentemente associada à infecção por cada espécie também está indicada na figura. Adaptado de Bielska & May (2016).

1.3 Fatores de virulência

Ao longo da evolução, as leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* desenvolveram mecanismos que, quando expressos, auxiliam no sucesso da infecção, dependendo também da suscetibilidade de seu hospedeiro. Estes mecanismos são conhecidos como fatores de virulência. Tanto *C. gattii* quanto *C. neoformans* possuem fatores de virulência bem estabelecidos, como a capacidade de crescimento a 37 °C, produção de uma cápsula polissacarídica e produção de melanina. Além

destes três principais fatores, estudos demonstram que as enzimas urease e fosfolipase também contribuem com a virulência de *Cryptococcus* sp (Sabiiti & May 2012).

1.3.1 Termotolerância

A capacidade de crescimento a 37 °C relaciona-se à capacidade de sobrevivência no hospedeiro humano. Portanto, somente fungos capazes de se proliferar à temperatura corporal humana provocam infecções. Um dos genes relacionados a este fator é o *CNAC1*, o qual codifica uma proteína calcineurina, a qual é ativada em condições de mudança de temperatura, promovendo a desfosforilação de proteínas necessárias para o crescimento à 37 °C (Kraus et al. 2005). Em geral, mutantes nulos para este gene em *C. neoformans* e *C. gattii* são menos virulentos (Bielska & May 2016). No entanto, mutantes *cnac1Δ* de *C. gattii* do tipo molecular VGIIa, provenientes do surto infeccioso que ocorreu em Vancouver em 1999, demonstram manter a capacidade de crescimento a 37 °C, reforçando que existem outros mecanismos regulando este fator (Chen et al. 2013).

1.3.2 Cápsula polissacarídica

Além da parede celular composta por oligômeros de quitina e quitosana, as leveduras *C. neoformans* e *C. gattii* também estão envolvidas por uma cápsula polissacarídica altamente hidratada e negativamente carregada, composta principalmente pelos polissacarídeos glucuronoxilomanana (GXM), galactoxilomanana (GalXM) e por manoproteínas (Coelho et al. 2014; Bielska & May 2016). A cápsula exerce função imunomodulatória no hospedeiro, sendo considerada um fator essencial para a virulência da levedura (Vecchiarelli et al., 2013). A estrutura da cápsula é bastante dinâmica, sendo modulada conforme a condição fisiológica em que se encontra a levedura. Durante o processo de infecção, por exemplo, a cápsula pode assumir um tamanho muitas vezes maior do que o diâmetro do corpo celular (Feldmesser et al. 2001; Coelho et al. 2014). Esta estratégia confere vantagens ao fungo no processo de interação patógeno-hospedeiro. Acredita-se que a principal função da cápsula é interferir no processo de fagocitose, pois há ausência da mesma quando as células fúngicas não são opsonizadas por anticorpos (Shoham & Levitz 2005). Além disso, a cápsula é capaz de alterar a migração de células do sistema imunológico do hospedeiro (Ellerbroek et al. 2004), inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Siegemund & Alber 2008), inativar o sistema do complemento (Villena et al. 2008) e também impedir a proliferação de células do sistema imune inato (Lupo et

al. 2008).

1.3.3 Produção de melanina

A produção de melanina é um importante fator de virulência em *Cryptococcus* sp. Este pigmento é produzido pela enzima lacase e mutantes nulos de *C. neoformans* para essa enzima têm sua virulência atenuada em modelo murino de infecção (Salas et al. 1996). Além disso, as células melanizadas são mais resistentes aos efeitos de determinados antifúngicos, como a anfotericina B e caspofungina, e a microbicidas oxidantes. Sendo assim, a melanização influencia no processo de infecção uma vez que o pigmento reduz a resposta imunológica do hospedeiro e a atividade terapêutica de alguns medicamentos (Nosanchuk & Casadevall 2006).

1.3.4 Urease

A enzima urease é responsável pela hidrólise da ureia, gerando amônia e CO₂, o que facilita a captação de nitrogênio pela levedura. A urease Ure1 é um importante fator de virulência de *Cryptococcus* (Sabiiti & May 2012). Apesar de esta enzima não ser necessária para o crescimento da levedura no cérebro, estudos demonstraram que ela está relacionada com a disseminação de *Cryptococcus* para o SNC, já que sua atividade aumenta o sequestro do fungo nos microcapilares sanguíneos durante a disseminação hematogênica (Olszewski et al. 2004). Este sequestro aumenta a aderência e toxicidade da levedura em células do endotélio cerebral, conforme observado por Charlier et al. (2005). Além disso, Cox et al. (2000) demonstraram que mutantes nulos *ure1Δ* não foram capazes de causar meningoencefalite em modelo murino de infecção, apenas infecções pulmonares. Em nosso grupo de pesquisa foram construídos mutantes nulos de *C. gattii* para *URE1*, gene codificador de urease, e para os genes que codificam as proteínas auxiliares Ure4 e Ure6, essenciais para a ativação de apoureases. Os resultados demonstraram os mutantes nulos *ure1Δ*, *ure4Δ* e *ure6Δ* apresentaram menor capacidade de crescimento no interior de macrófagos. Em camundongos infectados com os mutantes *ure1Δ* e *ure4Δ* observou-se uma redução na carga fúngica no pulmão e sangue e uma sobrevivência prolongada dos animais (Feder et al. 2015).

1.3.5 Fosfolipase

As fosfolipases são um grupo heterogêneo de enzimas capazes de hidrolisar uma ou mais ligações éster em fosfolípidos. Elas são divididas em cinco grupos, A1, A2, B, C e D, de acordo

com qual ligação éster que é hidrolisada. A atividade das fosfolipases pode resultar na desestabilização de membranas, lise celular e liberação de sinais que auxiliam na infecção pulmonar e disseminação da levedura (Ghannoum 2000). Acredita-se que as fosfolipases B e C são as mais relacionadas à virulência de fungos (Djordjevic 2010). A fosfolipase B é capaz de clivar dipalmitoilfosfatidilcolina, importante surfactante pulmonar, aumentando a aderência fúngica a células do epitélio pulmonar (Ganendren et al. 2006). Um estudo utilizando mutantes de fosfolipase B em *C. neoformans* demonstrou que a inativação do gene *PLB1* provocou menor taxa de replicação no interior de macrófagos e redução na virulência do fungo *in vivo* em dois modelos diferentes de infecção animal (Cox et al. 2001). A função da enzima fosfolipase C em *C. neoformans* também já foi investigada. Em um estudo realizado por Chayakulkeeree et al. (2008) foi observado que mutantes nulos para o gene *PLC1* foram incapazes de produzir os três principais fatores de virulência: cápsula e melanina e de crescimento a 37 °C.

1.4 Resposta imune do hospedeiro

É crucial que o sistema imunológico induza respostas que sejam capazes de erradicar ou controlar a infecção por *Cryptococcus* sp. antes que o fungo possa se disseminar no organismo do hospedeiro. A primeira linha de defesa contra a infecção são as células pulmonares do sistema imune inato, o que inclui macrófagos fagocitários, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais. Entretanto, o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, mediada por células T, é essencial para o controle efetivo da infecção tanto em modelos clínicos quanto experimentais (Gibson & Johnston 2015). Este tipo de resposta se inicia nos órgãos linfoides secundários, havendo o reconhecimento do complexo peptídeo-MHC exposto nas células apresentadoras de antígenos (APCs) por células T virgens, pois os linfócitos T não são capazes de reconhecer antígenos na forma nativa. Após a ativação das células T, por reconhecimento tanto de MHC do tipo I ou II, as mesmas se proliferam através da resposta autócrina à Interleucina-2 (IL-2) e podem ativar resposta de linfócitos T *helper* (CD4+) ou citotóxico (CD8+).

A principal resposta imune contra leveduras do gênero *Cryptococcus* ocorre através da ativação de linfócitos T *helper*, já que eles podem mediar a eliminação fúngica através do recrutamento de macrófagos e granulócitos. Porém, a ativação de linfócitos T citotóxicos não pode ser descartada, visto que já foi relatada a produção de INF- γ por células CD8+ independentemente de células CD4+, o que ajuda a conter o crescimento e sobrevivência de *C. neoformans* (Huffnagle et al. 1991; Lindell et al. 2005).

O combate efetivo à infecção por *C. neoformans* em modelo humano e murino está relacionado com uma resposta imune do tipo Th1, caracterizada pela secreção de INF- γ , TNF- α e

IL-12, ativação de macrófagos e indução da produção de anticorpos por linfócitos B para opsonização do patógeno (Miyagi et al. 2005; Blanco & Garcia 2008). Neste tipo de resposta, as leveduras são eliminadas pela ativação clássica de macrófagos (Zhang et al. 2009; Murdock et al. 2014). Também já foi demonstrado que uma resposta Th17, caracterizada pela secreção de IL-17A, IL-21, IL-22, IL-6, e TGF- β (Korn et al. 2007), é capaz de ativar macrófagos e ajudar na proteção do hospedeiro durante a criptococose (Murdock et al. 2014). Por outro lado, a indução de uma resposta anti-inflamatória do tipo Th2, a qual é caracterizada pela secreção de IL-4, IL-10 e IL-13, é capaz de promover a ativação alternativa de macrófagos. Este tipo de ativação está relacionado com o crescimento exacerbado de *C. neoformans*, assim como sua persistência no pulmão (Muller et al. 2007). Portanto, um desvio de resposta para o tipo Th2 está normalmente associado a formas mais severas da doença (Stenzel et al. 2009; Arora et al. 2011; Jarvis et al. 2013), o que é reforçado por relatos de que a troca de resposta Th1 para Th2 induz a expressão de fatores de virulência em *C. neoformans* (Osterholzer et al. 2009). Entretanto, um estudo demonstrou que apenas uma resposta Th1 e Th17 forte não foi capaz de proteger camundongos contra a infecção e disseminação de *C. neoformans* H99 para o sistema nervoso central (Zhang et al. 2009)

A efetividade de *C. gattii* em infectar pacientes imunocompetentes pode estar associada à modulação da maturação de células dendríticas. Estas células, como apresentadoras de antígenos, são eficazes em internalizar e eliminar células fúngicas de *C. gattii*. Porém, quando imaturas, as células dendríticas falham ao entrar no processo de maturação, não havendo aumento de expressão de MHC do tipo II, o que leva a uma resposta de células T diminuída (Huston et al., 2013). Esta hipótese é reforçada pela observação de um menor nível de linfócitos do tipo Th1 e Th17 nos pulmões de camundongos infectados por *C. gattii* R265 (Angkasekwinai et al. 2014) e também níveis reduzidos de neutrófilos em comparação a infecções causadas por *C. neoformans* H99 (Cheng et al. 2009). Recentemente um estudo mostrou que *C. gattii* JP02 (linhagem virulenta isolada no Japão) possui um ou dois grupos O-acetil da molécula de GXM modificados em relação aos grupos detectados em GXM de *C. neoformans* H99. A desacetilação de GXM resultou na diminuição da habilidade desta molécula de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias de células dendríticas, o que demonstra a importância dos grupos O-acetil de GXM no reconhecimento do sistema imune do hospedeiro. Assim, este estudo conclui que linhagens altamente virulentas de *C. gattii* devem possuir modificações estruturais na molécula de GXM que dificultam a sua detecção pelo sistema imunológico do hospedeiro, facilitando o processo de infecção em pacientes imunocompetentes (Urai et al. 2015).

Atualmente, os principais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose são fluconazol, flucitosina e anfotericina B. Devido à alta toxicidade destes compostos ao hospedeiro

e ao aumento do número de cepas resistentes, torna-se necessária a busca por inovações na área de estratégias terapêuticas para o tratamento da criptococose (Perfect & Bicanic 2015). Além da busca por moléculas com capacidade antifúngica, há um grande interesse na imunoterapia, através da utilização de anticorpos monoclonais e citocinas no tratamento da criptococose. O uso de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, melhora a resposta do sistema imune contra a infecção, e o uso de INF- γ mostrou ser importante para o controle do desenvolvimento da criptococose em pacientes HIV positivos (Gullo et al. 2013). A tentativa de tratamento utilizando imunização com anticorpos monoclonais contra o principal polissacarídeo da cápsula de *Cryptococcus*, glicosilceramidas, melanina e β -glicanas apresentaram excelentes resultados em modelos de infecção experimental (Antachopoulos & Walsh 2012). Além disso, a imunização com células dendríticas previamente apresentadas a mutantes acapsulares *cap60* de *C. gattii* geraram um aumento no número de células fagocíticas no pulmão e maior produção de IL-17A, INF γ e TNF α quando em camundongos infectados com *C. gattii* R265 (Ueno et al. 2015).

1.5 Manoproteínas

As manoproteínas correspondem a aproximadamente 1% da composição da cápsula de *Cryptococcus* (Levitz et al. 2001). Elas possuem algumas características essenciais, como a presença de uma região rica nos aminoácidos serina e treonina, local no qual ocorre a O-glicosilação, uma âncora de GPI e um peptídeo sinal para secreção (Levitz & Specht 2006). Através da âncora de GPI, a manoproteína pode se ligar à membrana plasmática ou à β -1,6-glicanos da parede celular, sendo que a clivagem da âncora pode levar à exportação da proteína (Djordjevic et al. 2005). No genoma de *C. neoformans*, foram encontrados 40 genes putativos codificadores de manoproteínas (Levitz & Specht 2006). Nesta levedura, as manoproteínas se encontram principalmente na parte interna da cápsula polissacarídica, próximas da parede celular e não associadas à GXM ou GalXM, ou são secretadas para o meio extracelular (Specht et al. 2007; Jesus et al. 2010).

Vários fungos expressam manoproteínas capazes de elicitar resposta imune no hospedeiro, como, por exemplo, *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium marneffeii* (Cao et al. 1998; Martínez et al. 1998; Chong et al. 2004). A capacidade das manoproteínas de interagirem com a parede celular fúngica pode contribuir com a patogenicidade dos mesmos, como visto para a manoproteína Epa1 de *Candida glabrata*, capaz de mediar a adesão a células epiteliais (Frieman et al. 2002). Diversas manoproteínas de *C. neoformans* já foram descritas como altamente imunogênicas, visto que podem regular a expressão de citocinas associadas a

respostas imunológicas do tipo Th1 e Th17, essenciais para a defesa do hospedeiro durante o desenvolvimento da criptococose (Pitzurra et al. 2000; Pietrella et al. 2001; Pietrella et al. 2002; Levitz & Specht 2006). Isso se deve, principalmente, ao fato de que manoproteínas são altamente glicosiladas com resíduos de manose, os quais são reconhecidos por receptores de manose em células dendríticas, induzindo uma resposta imune mediada por células T (Lam et al. 2005). Este fato foi reforçado quando a manoproteína MP98 recombinante e glicosilada de *C. neoformans* mostrou induzir resposta de células T CD4⁺ mais eficientemente, quando comparada a MP98 recombinante não glicosilada, mostrando a importância da glicosilação como fator imunogênico nas manoproteínas. Neste mesmo trabalho foi demonstrado que a resposta de células T foi diminuída quando células dendríticas foram pré-incubadas por inibidores dos receptores de manose, o que reforça o papel das mesmas como apresentadoras de antígenos (Specht et al. 2007). Em outro trabalho, a manoproteína MP88 de *C. neoformans* também mostrou estar envolvida na ativação de células T (Huang et al. 2002).

Previamente, foi realizado por nosso grupo de pesquisa uma análise transcricional de *C. gattii* linhagem R265 durante o processo de infecção em camundongos e também em condições de privação de micronutrientes, pela ação de quelantes de zinco (TPEN) e cobre (BCS) (Schneider et al. 2012; Staats, dados não publicados). Os resultados demonstraram um aumento significativo dos níveis de transcritos do gene CNBG4278 durante o processo de infecção em relação aos níveis obtidos nas condições de ausência dos micronutrientes (Figura 3). O gene CNBG4278 possui 1427 nucleotídeos e codifica uma manoproteína hipotética de 411 aminoácidos com massa molecular predita de 43 kDa. No genoma de *C. gattii* existe apenas uma cópia deste gene, sendo ele conservado em algumas espécies de fungos, entretanto sem ortólogos descritos no genoma de *Homo sapiens*. Seu ortólogo em *C. neoformans*, CNAG05595, já teve sua proteína e mRNA identificados em vesículas extracelulares (Rodrigues et al. 2008; Peres da Silva et al. 2015) e a proteína detectada em seu secretoma (Geddes et al. 2015). CNAG05595 apresenta menores níveis de expressão no mutante *cap10*, incapaz de produzir cápsula polissacarídica (Grijpstra 2008). Também foi relatado que CNAG05595 é diferencialmente expresso em mutantes de *C. neoformans* para os genes *bck1* e *mkk2*, ambos envolvidos na expressão de proteínas quinases essenciais para a manutenção da integridade da parede celular (Donlin et al. 2014).

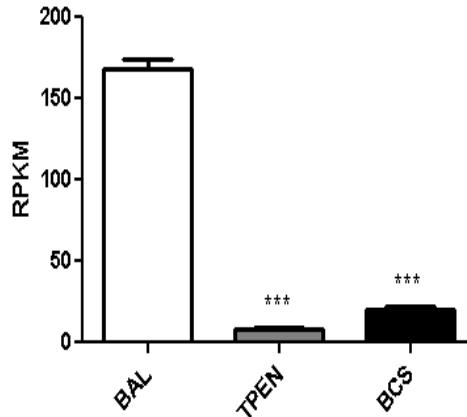


Figura 3. Níveis relativos de transcritos que codificam CNBG4278 em condições de interação com o hospedeiro e na privação de micronutrientes. RPKM, número de *reads* mapeados da sequência de mRNA codificante da manoproteína dividido pelo tamanho do transcrito, normalizados pelo número total de *reads* da amostra. BAL, lavado brônquio-alveolar. TPEN, quelante de zinco. BCS, quelante de cobre. *** $p < 0,0001$ (Staats, dados não publicados).

Além da capacidade imunogênica, algumas manoproteínas de *C. neoformans* já foram descritas como importantes para o processo de infecção por estarem envolvidas no processo de adesão em células epiteliais e também na captação de ferro do meio extracelular. A manoproteína MP84 de *C. neoformans* demonstrou estar envolvida no processo de adesão da levedura a células epiteliais de pulmão logo no início da infecção, quando a cápsula polissacarídica ainda não foi induzida (Teixeira et al. 2014). A manoproteína Cig1 de *C. neoformans* é secretada para o meio extracelular e tem sua expressão aumentada em condições de privação de ferro. Em um estudo de Cadieux et al. (2013), a função da manoproteína Cig1 na absorção de componentes hemes para o interior da célula foi avaliada. Mutantes *cig1Δ*, quando incubados em meio rico em componentes heme, apresentaram um retardo de crescimento. Para avaliar a contribuição desta manoproteína para o crescimento em meios ricos nestes componentes, foram construídos mutantes para *CIG1* e para o gene codificador da ferroxidase CFO1. O mutante *cfo1Δ* e o duplo mutante *cig1Δ cfo1Δ* não cresceram em meio rico em compostos heme. No entanto, a reinserção de *CIG1* ao duplo mutante reparou este fenótipo, confirmando o envolvimento desta manoproteína no crescimento em meios ricos em heme. Além disso, o duplo mutante *cig1Δ cfo1Δ* de *C. neoformans* apresentou virulência atenuada quando testado em modelo murino de infecção. Estas propriedades, em conjunto com a habilidade de prolongar o tempo de sobrevivência de camundongos infectados por *C. neoformans* após imunização, suportam a utilização das manoproteínas como potenciais candidatas à imunoterapia e no desenvolvimento de vacinas contra a criptococose (Mansour et al. 2002; Lam et al. 2005; Levitz & Specht 2006). Apesar de manoproteínas possuírem funções

promissoras, todos os estudos de função, localização e imunogenicidade de manoproteínas descritas na literatura atualmente são provenientes de *C. neoformans*, não havendo nenhuma descrição sobre as mesmas em *C. gattii*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Construir mutante de superexpressão para a análise funcional do gene codificador da manoproteína CNBG4278 de *Cryptococcus gattii*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Construir vetor de superexpressão de CNBG4278 em *C. gattii*;
2. Selecionar genótipos dos transformantes;
3. Realizar testes fenotípicos para caracterização funcional de CNBG4278.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares, plasmídeos, meios de cultura e oligonucleotídeos

A linhagem de *C. gattii* R265, proveniente do surto infeccioso que ocorreu em Vancouver (Canadá, 1999), foi utilizada como tipo selvagem neste estudo, sendo gentilmente doada pelo Dr. Wieland Meyer. Esta linhagem foi utilizada na construção de mutantes para o gene CNBG4278. Os mutantes nulo (*cnbg4278Δ*) e complementado (*cnbg4278Δ::CNBG4278*) para o gene de interesse foram anteriormente construídos por Reuwsaat, J.C.V. (dados não publicados). Para a construção do cassete de superexpressão, utilizamos o DNA genômico da linhagem H99 de *C. neoformans* e o cDNA de *C. gattii* R265. Todas as linhagens foram cultivadas em meio YPD (2% glicose, 2% peptona e 1% extrato de levedura e 1,5% (m/v) ágar, quando necessário). Neste trabalho, utilizamos o plasmídeo pJAF1, o qual possui marca de seleção para gentamicina (G418) em *Cryptococcus* sp. (Fraser et al. 2003). Para a propagação do cassete de superexpressão, células de *E. coli* TOP10F foram utilizadas. Seu cultivo foi realizado em meio *Luria Broth* (LB), acrescido de 1,5% (m/v) de ágar, quando necessário. Placas de YPD sólido suplementadas G418 (200 µg/mL) foram utilizadas para a seleção dos mutantes de superexpressão. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e suas finalidades estão listados na Tabela 1.

4.2 Construção dos mutantes de superexpressão do gene CNBG4278

Para a construção de mutantes de superexpressão, a região codificadora de CNBG4278 de *C. gattii* R265 foi clonada sob a regulação das sequências promotora e terminadora do gene de histona H3 de *C. neoformans*. Para tanto, foram utilizados 3 diferentes conjuntos de *primers*: H3P_F/H3P_R; H3T_F/H3T_R; Exp_F/Exp_R (Tabela 1). A amplificação das regiões promotora e terminadora foi realizada utilizando o DNA genômico de *C. neoformans* H99 como molde; já para a amplificação do fragmento codificador, utilizou-se cDNA de *C. gattii* R265. Após a amplificação e purificação dos fragmentos (PureLink™ Quick Gel Extraction; Invitrogen, Alemanha) foi realizada uma reação de PCR com os *primers* H3P_F e H3T_R, utilizando como molde 5 ng dos fragmentos referentes à região promotora e terminadora e 10 ng do fragmento correspondente à sequência codificadora. Como resultado, foi gerado um *amplicon* de aproximadamente 2,4 kb. Após a purificação, o fragmento foi clonado no vetor pJAF1, previamente clivado com a enzima de restrição EcoRI 10 U/µL (ThermoScientific), utilizando o

kit de clonagem In-Fusion[®] HD EcoDry[™] (Clontech), de acordo com o protocolo do fabricante. Para esta reação foram adicionados 100 ng do vetor linearizado e 100 ng do fragmento de 2,4 kb em um volume final de 10 µL. O vetor recombinante gerado foi transformado em células de *E. coli* TOP10F. Após a confirmação da construção, células de *C. gattii* *cnbg4278Δ* foram transformadas via biobalística, de acordo com o protocolo descrito por Toffaletti et al. 1993 e selecionadas em meio YPD sólido contendo 200 µg/ml de gentamicina (G418).

4.3 Clivagens e enzimas de restrição

Para a reação de ligação entre o fragmento de interesse e o vetor pJAF1, este foi previamente linearizado com a enzima de restrição EcoRI 10 U/µL (ThermoScientific). Nesta reação, 2 µL de vetor (1 µg) foi tratado com 1 µL da enzima, 1 µL de tampão 10x e H₂O *milliQ* para completar o volume final de 10 µL. Após 1 h 30 min de incubação a 37 °C, a reação foi inativada por 15 min a 65 °C.

Com a finalidade de confirmar a construção do vetor recombinante pJAF1_CNBG4278 foram realizadas clivagens com as enzimas de restrição BglII 10 U/µL (Promega) e XhoI 10 U/µL (Promega). Para ambas as reações utilizamos 0,5 µL da enzima de restrição, 2 µL de tampão 10x, 0,2 µL de BSA 1 mg/mL, 0,5 µL de pJAF1_CNBG4278 (1 µg) e H₂O *milliQ* para um volume final de reação de 20 µL. As reações foram incubadas por 1 h a 37 °C e inativadas por 15 min a 65 °C.

4.4 Extração de DNA genômico e plasmidial

Para a extração de DNA genômico dos transformantes, cada linhagem foi incubada a 37 °C e 200 rpm em 20 mL de meio YPD líquido. Após 24 h, 10 mL do cultivo foi centrifugado e as células foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato salino estéril (PBS 1x - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄) e submetidas à liofilização por um período entre 48 e 72 h. O pellet celular liofilizado foi macerado 3 vezes com nitrogênio líquido e adicionado à 4 mL do tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA; 200 mM NaCl; 2% Triton X-100; 1% SDS). A suspensão foi agitada e 2 mL de clorofórmio e 1 mL de fenol foram adicionados a mesma. Após agitação seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 20 min, a fase aquosa foi aliquoteada (500 µL) em tubos *ependorf* de 1,5 mL. O equivalente a 1 volume da solução aquosa recuperada foi adicionado de clorofórmio às alíquotas, seguido de centrifugação a velocidade máxima por 15 min. A fase aquosa foi novamente coletada e precipitada *overnight*

com 1 V de isopropanol e 0,2 M de NaCl a -20 °C. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 13.000 rpm, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi lavado com 200 µL de etanol 70% gelado. Após a retirada do etanol e secagem, o DNA foi ressuspensionado em água *milliQ* e tratado com 50 µg/mL de RNase por 30 min a 37 °C.

Para a extração plasmidial, transformantes positivos de *E. coli* foram cultivados em 3 mL de meio LB com o antibiótico apropriado a 37 °C. Após 16 h de incubação, o cultivo foi centrifugado a 14.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e, ao pellet celular, foram adicionados 150 µL da solução de lise I gelada (50 mM Glicose; 25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8). O pellet foi ressuspensionado através de agitação vigorosa em vórtex e, em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de lise II (SDS 0,1% e NaCl 0,2 M). A suspensão foi misturada suavemente por inversão do tubo por 5 vezes. Após, 150 µL da solução de lise III (60 mL acetato de potássio 5 M; 11,5 mL ácido acético glacial - 99,5% de pureza; 28,5 mL H₂O *milliQ*) foram adicionados e misturados suavemente. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 14.000 x g e o sobrenadante foi coletado em outro frasco. Foram adicionados clorofórmio e fenol em volumes equivalentes a 0,5 do volume de solução aquosa recuperada. Após agitação, as alíquotas foram novamente centrifugadas por 10 min a 14.000 x g e o sobrenadante aquoso foi coletado em outro frasco. O equivalente a 0,5 do volume da solução aquosa recuperada foi adicionado de clorofórmio e fenol às alíquotas, seguido de centrifugação por 10 min a 14.000 x g. A fase aquosa foi novamente coletada em outro frasco e as amostras foram precipitadas com 2 volumes de etanol absoluto e 0,2 M de NaCl. Após 1 hora de precipitação a -20°C, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 14.000 x g e posteriormente lavadas com etanol 70%. Após a secagem, o pellet plasmidial foi ressuspensionado em H₂O *milliQ*.

Para a extração plasmidial em maior quantidade, utilizamos o kit *PureLink™ Hi Pure Plasmid Midiprep Kit* (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. O plasmídeo extraído por esta técnica foi utilizado para o bombardeamento de *cnbg4278Δ*.

4.5 Extração de RNA

Para a extração de RNA de células de *C. gattii*, estas foram cultivadas por 18 h a 30 °C em 20 ml de YPD líquido. O cultivo foi centrifugado a 7.000 x g por 10 min e as células foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e maceradas. Uma alíquota do macerado foi transferida para um tubo contendo 1 mL do reagente TRIzol (*Life Technologies*). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 10 °C. O sobrenadante da centrifugação foi retirado e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, 0,2 mL de clorofórmio foi adicionado ao sobrenadante e ambos foram misturados por inversão rigorosa

do tubo por 15 segundos. Após 3 minutos de incubação em temperatura ambiente, a amostra foi submetida à centrifugação a 12.000 x g por 15 min, a 10 °C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol a temperatura ambiente por 30 min. Após este período, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 10 min a 10 °C e posteriormente lavada com etanol 70 %. A amostra foi ressuspensa em água previamente tratada com DEPC. Após quantificação, aproximadamente 1 µg de RNA foi tratado com DNase 1 U/µL (*Thermo Scientific*) por 30 min a 37 °C e inativada conforme instruções do fabricante. A eficácia do tratamento foi verificada por PCR utilizando os primers Act (Tabela 1). Para síntese de cDNA, foi utilizada a enzima transcriptase reversa (RT) Improm II (Promega) e 0,2 µg de RNA previamente tratado com DNase, conforme instruções do fabricante. A reação foi incubada a 42 °C por 1 h.

4.6 RT-PCR e Real Time RT-qPCR

Para análises de *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR) e de *Real Time Quantitative Reverse Transcriptase* PCR (*Real Time* RT-qPCR), o RNA de células de *C. gattii* R265 e dos mutantes foi extraído e cDNA foi sintetizado conforme descrito anteriormente. Para os experimentos de RT-PCR, o cDNA de cada linhagem foi utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando a enzima *Taq DNA Polymerase recombinant* 5 U/uL (Invitrogen) em um volume final de 25 µL, sendo utilizado 0,1 µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 2,5 µL do tampão apropriado, 2,5 µL dNTP (10 pmol/µL), 1 µL MgCl₂ 50 mM, 1 µL de cada *primer* (RT4_F e RT4_R - 10 pmol/µL) e H₂O *milliQ* para completar o volume adequado. A reação foi realizada em condições cíclicas de temperatura que se iniciam com 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclo de 95 °C por 5 min, 55 °C por 30 s e 72 °C por 60 s e finalizando com 72 °C por 5 min.

Para as análises de *Real Time* RT-qPCR foi utilizado o sistema *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) em condições cíclicas de temperatura, iniciando com 94 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 10 s e 72 °C por 15 s e 60 °C por 35 s. Na reação foram adicionados: 0,1 µL de *Platinum® Taq DNA Polymerase* 5 U/uL (Invitrogen); 2 µL de tampão 10 x; 0,1 µL de dNTP (5 pmol/µL); 1,2 µL MgSO₄ 50 mM; 0,2 µL de cada *primer* (5 pmol/µl) (RT3_F e RT3_R); 2,0 µL de *SYBR® green* (diluição 1:100) (Invitrogen), e 2 µL de cDNA (10 ng) como molde para um volume final de reação de 20 µL. Todos os experimentos foram realizados a partir de três cultivos independentes e cada amostra de cDNA foi analisada em triplicada. A análise da *melting curve* foi realizada no final da reação para confirmar a presença de um único produto de PCR. Actina foi utilizada como gene normalizador e a expressão relativa foi calculada pelo método de 2^{-ΔCt} (Livak & Schmittgen 2001). A análise estatística foi realizada

por *One-way* ANOVA, seguida de teste de Tukey.

4.7 Ensaios de caracterização fenotípica

4.7.1 Avaliação do crescimento a 30 e 37 °C e testes de sensibilidade a estressores osmóticos e de parede celular

As linhagens estudadas foram cultivados em meio YPD a 30 °C e 200 rpm. Após 16 h, as células foram lavadas em PBS 1x estéril e a densidade celular foi ajustada para 10^7 células/mL. As suspensões celulares foram diluídas em série até a concentração de 10^2 células/mL. Nos ensaios para avaliação do crescimento celular, 3 µL de cada suspensão foram pipetados em meio YPD sólido e incubados a 30 e 37 °C por 48 h. Para avaliar a sensibilidade a estresse osmótico, 3 µL de cada suspensão foram pipetados em meio YPD sólido suplementado com CaCl_2 1,5 M e com NaCl 1,5 M, enquanto que os testes para a avaliação da integridade da parede celular foram realizados em meio YPD sólido suplementado com SDS 0,005%, Calcofluor 300 µg/mL, Congo Red 5 mg/mL e 400 mg/mL. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h e fotografadas.

4.7.2 Avaliação da síntese de melanina

A avaliação da síntese de melanina foi conduzida seguindo a metodologia descrita por Baker et al. 2007. Células de *C. gattii* R265, *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62 foram cultivadas a 30 °C por 80 h em meio mínimo líquido (1 g/L asparagina, 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g/L KH_2PO_4 , e 3 µM tiamina) acrescido de 1 mM de dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA), conforme descrito por Kmetzsch et al. 2011. Após 24, 48 e 80 h, 1 mL de cada cultivo foi centrifugado por 10 min a 1,000 x g. Os *pellets* celulares foram fotografados para análise visual de pigmentação e os sobrenadantes foram analisados por espectroscopia (absorbância 492 nm). Os resultados foram analisados pelo teste estatístico *Two-Way* ANOVA.

4.7.3 Indução de cápsula

A fim de mensurar a cápsula de *C. gattii* R265, *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62, estes foram cultivados em 20 mL de YPD líquido a 30 °C e 200 rpm. Após 18 h, 1,5 mL do cultivo foi centrifugado, as células foram lavadas e

ressuspendidas em PBS 1x estéril. Um volume referente à densidade celular de 10^7 células/mL foi adicionado a poços de placa de 24 poços contendo *Dulbecco's Modified Eagle's medium* (DMEM) completo. Após 48 h de incubação a 37 °C e 5 % CO₂, as células foram centrifugadas a 6.000 rpm por 2 min, lavadas 3 vezes com PBS 1x estéril e fixadas com paraformaldeído 4 % a 37 °C por 30 min e guardadas na geladeira. Para a visualização, as células foram coradas com tinta nanquim e analisadas no microscópio Axioskop 40 (Zeiss, Alemanha). As imagens foram capturadas pela câmera AxioCam MRC (Zeiss, Alemanha) e processadas pelo software analySIS (Soft Image System). O tamanho da célula e cápsula foram mensurados utilizando o software ImageJ (NIH, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>). O tamanho da cápsula foi definido pela razão entre o diâmetro total da célula e o diâmetro do corpo celular. Foram mensuradas 50 células de cada linhagem e os resultados foram analisados por *One-Way* ANOVA.

4.7.4 Avaliação da atividade de fosfolipase

As linhagens de *C. gattii* R265, *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62 foram testadas para a produção de fosfolipase através do método descrito por Price et al. 1982. Resumidamente, as linhagens foram cultivadas em 20 mL de YPD líquido a 30 °C e 200 rpm. Após 18 h, 2 mL do cultivo foram centrifugados, as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS 1x estéril. A densidade celular foi ajustada para 1×10^6 células/mL e 1,5 µL de cada suspensão celular foi aplicado ao meio de cultivo. O meio utilizado para o teste foi *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), acrescido de 1 M de NaCl, 0,005 M de CaCl₂ e 8 % de gema de ovo estéril. Previamente ao preparo do meio, a gema foi centrifugada por 10 min a 500 x g e o volume de sobrenadante apropriado foi coletado. O diâmetro da colônia e da zona de precipitação foram medidos pelo software ImageJ (NIH, <http://rbs.info.nih.gov/ij/>) após 96 h de incubação à 30 °C. A atividade de fosfolipase (Pz) foi determinada a partir da razão entre os diâmetros da colônia (dc) e diâmetro da colônia e sua zona de precipitação (dcp) (Price et al. 1982; Djordjevic 2010). Se $Pz = 1$, a atividade é considerada negativa; $1 > Pz > 0,64$ a atividade é positiva; e $Pz < 0,64$ a atividade é fortemente positiva (Price et al. 1982). O experimento foi realizado em triplicata e os valores utilizados são a média dos valores da triplicata de cada amostra. Os resultados foram avaliados estatisticamente por *One-Way* ANOVA.

4.7.5 Avaliação da atividade de urease

Para a avaliação da atividade de urease realizamos o teste colorimétrico descrito por Kwon-Chung et al. 1987. As linhagens de *C. neoformans* H99, *C. gattii* R265 e *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-PH3CNBG4278* 19, 38 e 62 foram cultivadas overnight em meio YPD. Após duas lavagens com H₂O *milliQ* estéril, 2×10^7 de cada linhagem foram adicionadas a 1 mL do meio 2x *Roberts Urea Broth* filtrado (66.6 mM ureia; 0.2 g/L extrato de levedura; 0.0056 mM vermelho fenol; 2 mM KH₂PO₄; 2 mM Na₂HPO₄). As suspensões foram incubadas por 6 h a 37 °C. Após este período, as amostras foram centrifugadas (5 min a 6.000 rpm) e 1 mL do sobrenadante foi recuperado e sua OD_(560nm) foi medida. A atividade foi considerada positiva quando OD_(560nm) > 0.3. Os resultados foram avaliados estatisticamente por *One-Way* ANOVA, utilizando como referência a linhagem R265.

4.8 Ensaio de fagocitose em macrófagos murinos J774.A1

Os ensaios de fagocitose foram realizados para avaliar a suscetibilidade das linhagens *C. gattii* R265, *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62 à ação antifúngica de fagócitos. Para este experimento foi utilizada a linhagem J774.A1 de macrófagos murinos, as quais foram aderidas em uma densidade de 10⁵ células em placa de 96 poços contendo DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). Após 18 h de incubação a 37 °C e 5 % CO₂, o meio foi substituído por suspensões de células fúngicas (10⁶ células), previamente opsonizadas com o anticorpo anti-GXM 18B7, amplamente utilizado em ensaios de fagocitose. As placas foram incubadas por 2 h e 24 h. Após o período de incubação, as células não fagocitadas foram removidas através de lavagem com PBS 1x três vezes. A avaliação da sobrevivência fúngica foi avaliada através da lise dos macrófagos com água *milliQ* gelada e posterior plaqueamento em YPD sólido. A contagem de unidades formadoras de colônia (CFU) foi realizada em triplicata. O experimento foi feito em triplicata para cada linhagem e teste T foi realizado para determinar a significância estatística entre as diferentes taxas de sobrevivência observadas.

Tabela 1. *Primers* utilizados neste trabalho.

Primers	Sequência	Finalidade
H3P	H3P_F: 5'-GCGAATTCTGCAGATGAGCTCGGCAGATACGAT-3' H3P_R: 5'-AGCGGCGGCGGCGAGCATGGTGATAGATGTGTTGTGGT-3'	Amplificam região promotora do gene de histona H3 em <i>C. neoformans</i> .
H3T	H3T_F: 5'-TGCTGGTATCCTCATGTAACAGCTTTTATTAGCTTGG-3' H3T_R: 5'-GCCAGTGTGATGGATCTTGTACGCTTGATTGTTCT-3'	Amplificam região terminadora do gene de histona H3 em <i>C. neoformans</i> .
Exp	Exp_F: 5'-ACCACAACACATCTATCACCATGCTCGCCGCCGCCGCT-3' Exp_R: 5'-CCAAGCTAATAAAAGCTGTTACATGAGGATACCAGCA-3'	Amplificam região codificadora de CNBG4278 em <i>C. gattii</i> .
Act	Act_F: 5'-CGGTATCGTCACAAACTGG-3' Act_R: 5'-GGAGCCTCGGTAAGAAC-3'	Amplificam gene da actina em <i>C. gattii</i> .
RT3	RT3_F: 5'-ACGACTTGAGCAGCATCTAC-3' RT3_R: 5'-GGGTGAAGAATACATTGGTG-3'	Análise dos níveis de transcritos de CNBG4278 por <i>Real Time</i> RT-qPCR.
RT4	RT4_F: 5'-TCAAGTGACACCCTCAGATG-3 RT4_R: 5'-CACCACGAAAATGTAAGCAG-3	RT-PCR para a confirmação dos mutantes de CNBG4278.

5. RESULTADOS

5.1 Construção do cassette de superexpressão

Para a construção do cassette de superexpressão de CNBG4278, a ORF codificadora do gene de interesse foi clonada sob a regulação das regiões promotora e terminadora do gene de histona H3 de *C. neoformans*. Estas três sequências distintas foram amplificadas separadamente, utilizando como molde o DNA genômico de *C. neoformans* H99 (promotor e terminador) e cDNA de *C. gattii* R265 (ORF). Após a purificação dos fragmentos amplificados, estes foram associados através de PCR *Double Joint* (Yu et al. 2004), resultando em um único *amplicon* de aproximadamente 2,4 kb (Figura 4A), o qual foi clonado no plasmídeo pJAF1. O vetor escolhido possui 5.827 pb e marca de seleção à ampicilina em *E. coli* e à gentamicina (G418) em *C. gattii* (Figura 4B).

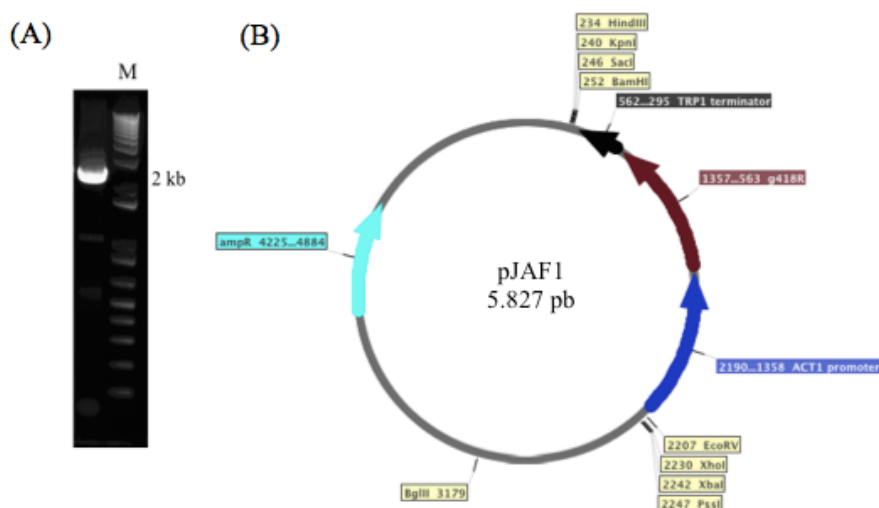


Figura 4. Fragmento de 2,4 kb gerado por PCR *Double Joint* e mapa do plasmídeo pJAF1. (A) O fragmento consiste na região promotora da histona H3 de *C. neoformans*, região codificadora de CNBG4278 de *C. gattii* e região terminadora da histona H3 de *C. neoformans*. M, marcador de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder. (B) Mapa do vetor pJAF1 utilizado para a clonagem do inserto e transformação em *C. gattii* R265. Em vermelho, região codificadora da marca de resistência a G418.

A reação de ligação do *amplicon* ao plasmídeo resultou em um vetor recombinante de aproximadamente 8,2 kb, o qual foi transformado em células de *E. coli* TOP10F. Realizamos o

screening de colônias positivas através da extração plasmidial (Figura 5A) e posterior clivagem com as enzimas de restrição XhoI, gerando dois fragmentos (6244 pb e 1975 pb) (Figura 5B). Dos quatro possíveis transformantes obtidos, isolamos novamente o plasmídeo recombinante da colônia 7. Para assegurar que a construção estava correta, realizamos uma nova clivagem com XhoI e também com BglII (Figura 5C).

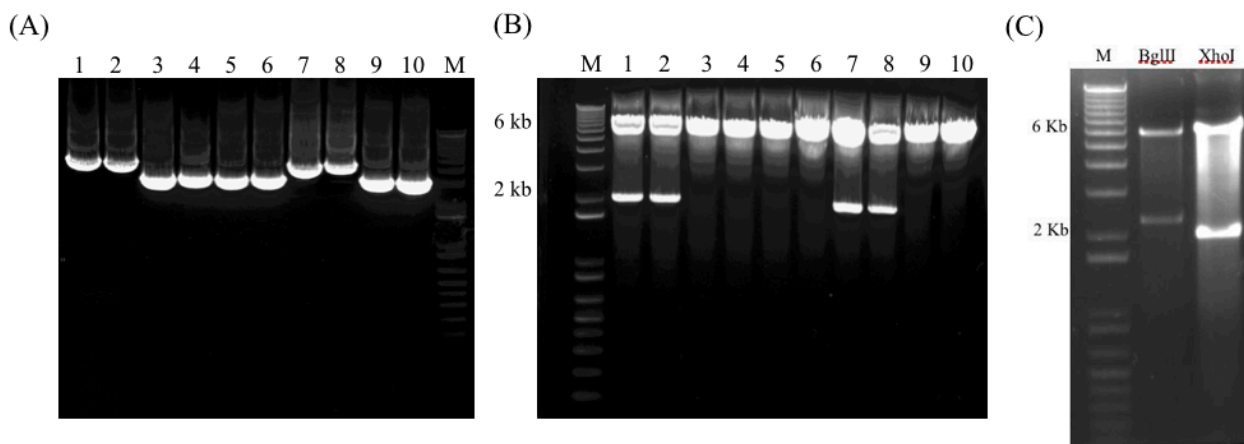


Figura 5. Confirmação da construção de pJAF1_CNBG4278. (A) Os plasmídeos de 10 colônias de *E. coli* TOP10F foram extraídos e migrados em gel de agarose 0,8 %. Pode ser observada menor migração dos plasmídeos das colônias 1, 2, 7 e 8, indicando possíveis transformantes. (B) Clivagem dos plasmídeos extraídos com XhoI. Apenas as amostras 1, 2, 7 e 8 foram clivadas em fragmentos de tamanho esperado. (C) Clivagem do plasmídeo extraído da colônia 7 com BglII e XhoI. A construção foi confirmada pela geração de fragmentos de tamanho esperado. M, marcador de tamanho molecular 1KB plus DNA ladder, indicado em pares de base. BglII cliva o vetor em fragmentos de 5922 pb e 2297 pb. XhoI gera fragmentos de 6244 pb e 1975 pb.

5.2 Obtenção e confirmação de mutantes *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278*

O vetor pJAF1_CNBG4278 foi transformado em células da linhagem mutante *cnbg4278Δ* pelo método de biobalística, resultando em 125 colônias transformantes capazes de crescer em meio seletivo, contendo 200 µg/mL de gentamicina. O *screening* de transformantes foi realizado por PCR de colônia com os *primers* HP_F e HT_R. Extraímos o RNA total de 6 possíveis transformantes e sintetizamos cDNA para a realização de PCR quantitativo em tempo real (*Real Time* RT-qPCR) com o conjunto de *primers* RT4. Os 3 transformantes que apresentaram maiores

níveis relativos de mRNA de CNBG4278 foram selecionados para os experimentos seguintes (*cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38, 62) (Figura 6). Testes estatísticos não foram aplicados aos resultados, pois o experimento não foi realizado em triplicatas biológicas, apenas experimentais.

Após a seleção, realizamos um RT-PCR para confirmar todos os mutantes construídos e selecionados até o momento. Um RT-PCR para o gene da actina foi utilizado como controle (Figura 7). Posteriormente, foi feita uma nova análise por *Real Time* RT-qPCR para comparar os níveis relativos de transcritos de CNBG4278 entre *C. gattii* R265, mutante nulo (*cnbg4278Δ*), mutante complementado (*cnbg4278Δ::CNBG4278*) e mutantes de superexpressão (*cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62). Os resultados confirmaram a construção de todas as linhagens mutantes (Figura 8). Uma diferença estatística significativa foi observada nos níveis de mRNA relativo de todos os mutantes de superexpressão em relação à linhagem selvagem.

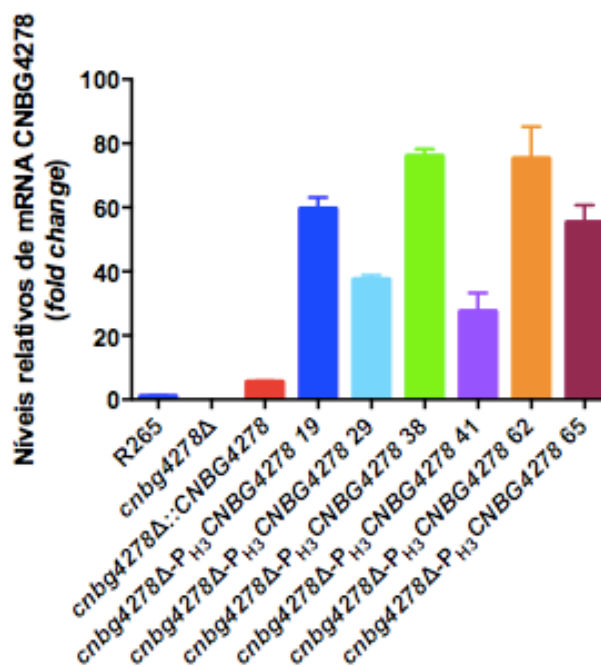


Figura 6. Níveis relativos de mRNA de CNBG4278 em mutantes de superexpressão obtidos por análise em *Real Time* RT-qPCR. A quantificação dos níveis de mRNA em cada amostra foi normalizada utilizando valores Ct obtidos para o gene da Actina. Os dados mostrados são a média de valores de triplicatas experimentais. Barras representam o desvio padrão de três réplicas técnicas.

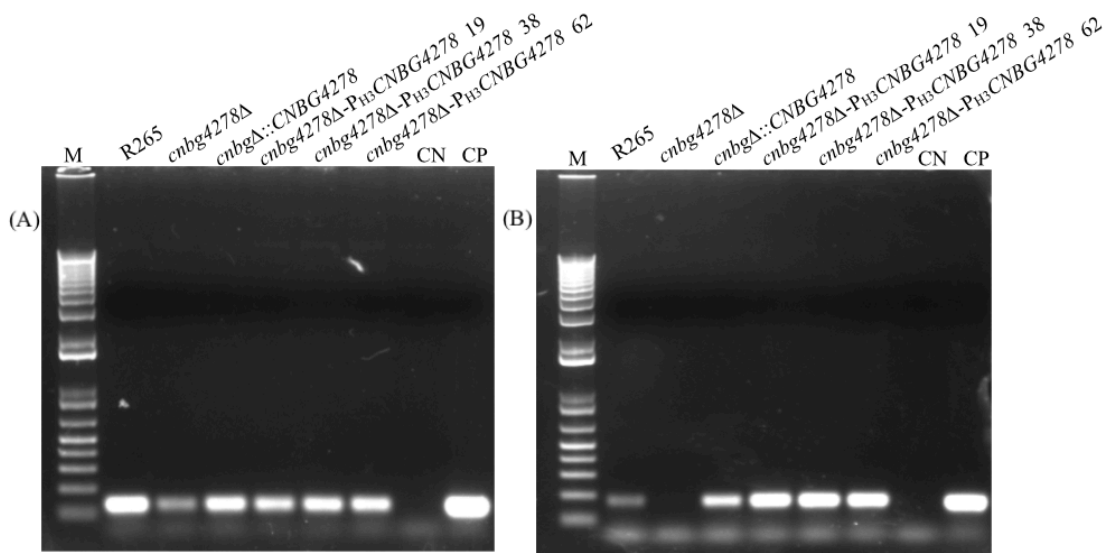


Figura 7. RT-PCR confirmatório. (A) RT-PCR para a amplificação do gene da actina, utilizado como controle. (B) RT-PCR com primers RT4. Os *primers* utilizados promovem a amplificação de um fragmento da região codificadora de CNBG4278 de aproximadamente 200 pb. M, marcador de tamanho molecular 1KB plus DNA ladder, indicado em pares de base. CN, controle negativo. CP, controle positivo.

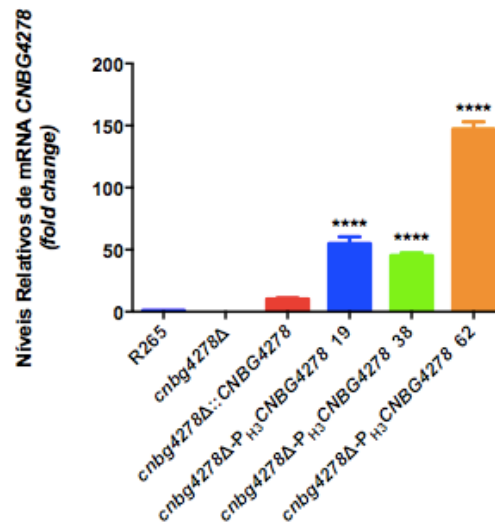


Figura 8. Níveis relativos de mRNA de CNBG4278 obtidos por Real Time RT-qPCR. A quantificação dos níveis de mRNA em cada amostra foi normalizada utilizando valores Ct obtidos para o gene da actina. O experimento foi realizado em triplicata biológica e experimental. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA seguida de teste de Tukey. Os asteriscos indicam $p < 0.001$ e as barras representam o desvio padrão entre as replicatas biológicas.

5.3 Testes Fenotípicos

5.3.1 Crescimento a 30 e 37 °C

Com a finalidade de verificar a habilidade de crescimento dos mutantes a 30 e 37 °C, temperatura corporal do hospedeiro, realizamos um teste utilizando diluições seriadas de 10^7 a 10^2 células/mL (Figura 9). As placas foram fotografadas após 48 h de incubação. Os resultados não demonstram diferença de crescimento entre os mutantes e *C. gattii* R265 nas temperaturas avaliadas, o que demonstra que o gene CNBG4278 não interfere no crescimento fúngico nas temperaturas testadas.

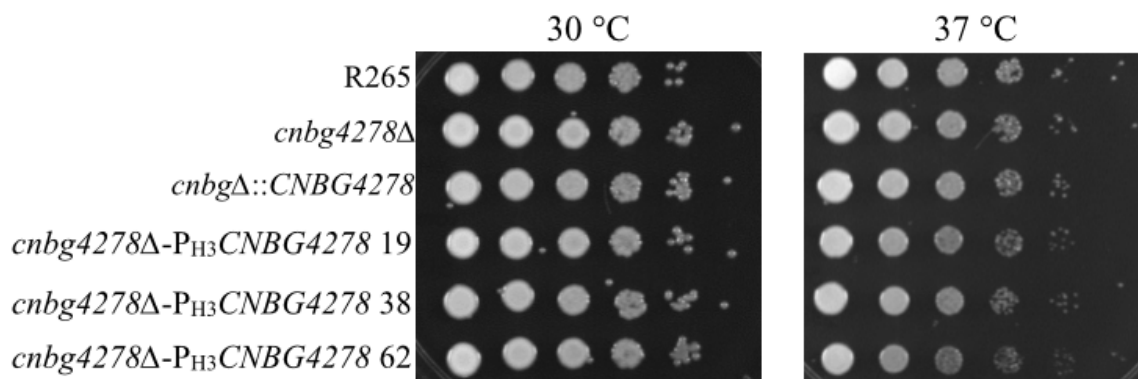


Figura 9. Análise de sensibilidade térmica a 30 e 37 °C dos mutantes de CNBG4278. Foi utilizado 3 µL de diluições seriadas de 10^7 a 10^2 células/mL. As placas foram incubadas a 30 e 37 °C durante 48 h.

5.3.2 Estresse osmótico e iônico

O teste para avaliar a suscetibilidade das linhagens a condições de estresse osmótico e iônico foi realizado em meios contendo NaCl 1,5 M e CaCl₂ 1,5 M. As placas foram fotografadas após 48 h de incubação a 30 °C. Não há diferença de crescimento entre mutantes e *C. gattii* R265 (Figura 10). Portanto, o gene CNBG4278 provavelmente não está envolvido em mecanismos de defesa relacionados a estes tipos de estresse.

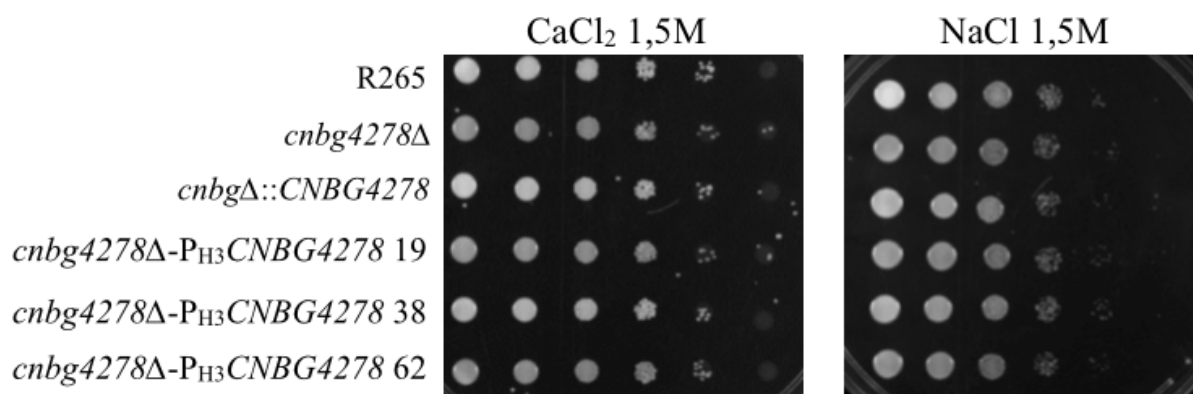


Figura 10. Análise de sensibilidade a estresse osmótico com CaCl_2 1,5 M e NaCl 1,5 M. Foi utilizado 3 μL de diluições seriadas de 10^7 a 10^2 células/mL. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h. Não foi observada diferença de crescimento entre mutantes e *C. gattii* R265 nas condições testadas.

5.3.3 Integridade da parede celular

As linhagens selvagem, *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62 foram cultivadas na presença de diferentes estressores de parede celular. Os estressores *Congo Red* e *Calcofluor White* são corantes iônicos que interferem na construção e resposta a estresse da parede celular através da interação com as cadeias de glucanas e quitinas, respectivamente (Ram & Klis 2006; Kopecká & Gabriel 1992; Roncero & Duran 1985). Já o Sódio Dodecil Sulfato (SDS) causa dano à parede celular, podendo causar a lise de células com defeitos na membrana (Carbó & Pérez-Martín 2010).

Os resultados obtidos demonstraram que os mutantes *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19 e 62 apresentam maior dificuldade de crescimento na presença de *Congo Red* 5 mg/mL quando comparados às demais linhagens. Além disso, nesta mesma condição, as linhagens R265, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 38 apresentam colônia fortemente escurecida quando plaqueadas nas diluições de 10^7 e 10^6 células/mL. Quando incubados em meio acrescido de SDS 0,005% e *Calcofluor White* 300 $\mu\text{g/mL}$ não há diferença visível de crescimento entre as linhagens (Figura 11).

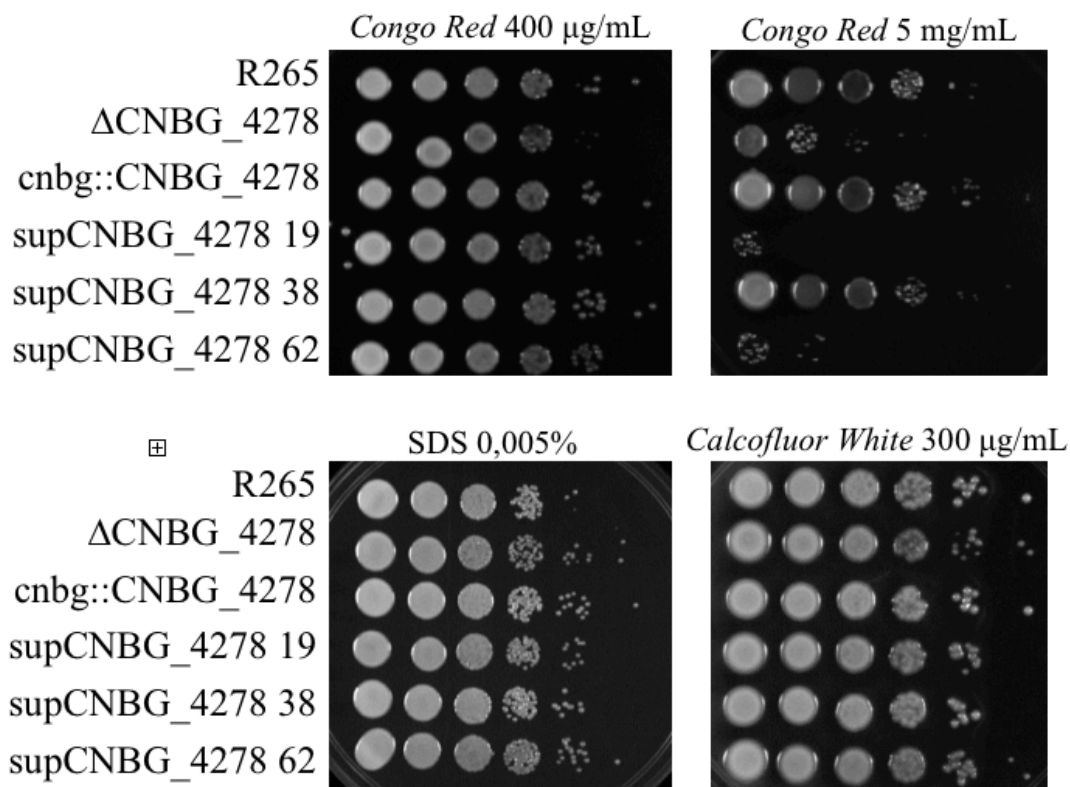
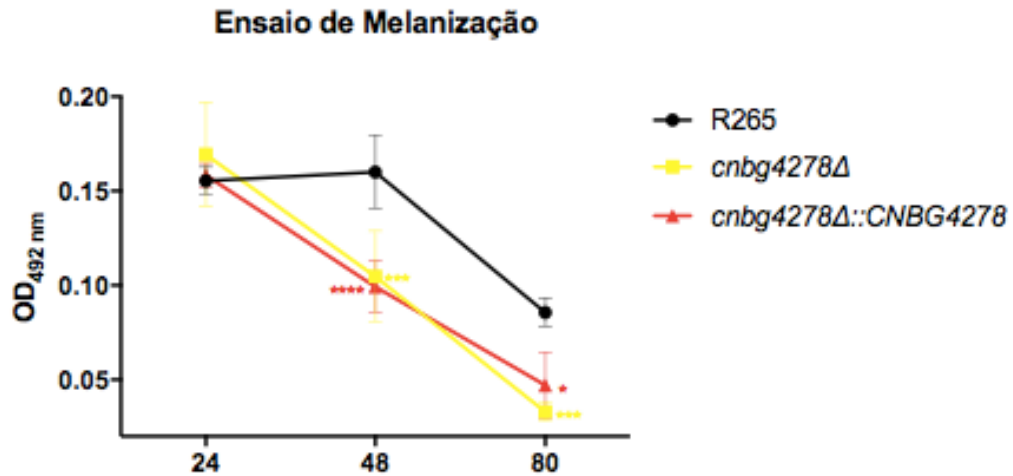


Figura 11. Análise da integridade da parede celular de mutantes de CNBG4278. As linhagens estudadas foram submetidas a crescimento com *Congo Red* 5 mg/mL e 400 µg/mL, SDS 0,005% e *Calcofluor White* 300 µg/mL.

5.3.4 Síntese de melanina

A indução da síntese de melanina foi realizada em meio mínimo líquido acrescido de L-DOPA. Os sobrenadantes foram analisados por espectroscopia (absorbância 492 nm) após 24, 48 e 80 h e o *pellet* celular foi fotografado para análise visual. Observa-se que a linhagem R265 apresenta secreção de melanina máxima em 48 h e, após este período, a secreção diminui. A linhagem *cnbg4278Δ-P_{H3}CNMG4278* 62 apresenta um padrão bastante semelhante ao da linhagem selvagem R265, mas a diminuição da secreção mostra-se mais acentuada após 48 h. As demais linhagens analisadas apresentam secreção de melanina diminuída a partir de 48 h, sendo que esta diferença é estatisticamente significativa quando os valores são comparados aos de R265 (Figura 12). Não há diferença visual na deposição de melanina na parede celular das linhagens testadas (Figura 13).

(A)



(B)

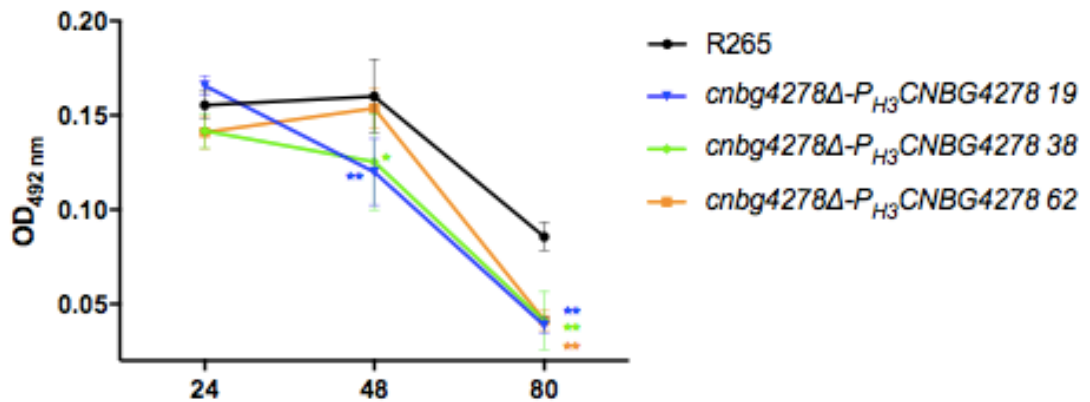


Figura 12. Ensaio de melanização em meio líquido. Após 24, 48 e 80 h de cultivo em meio mínimo com L-DOPA, a secreção de melanina dos mutantes foi quantificada por espectrofotometria (OD_{492nm}). (A) Secreção de melanina de R265, *cnbg4278Δ* e *cnbg4278Δ::CNBG4278*. (B) Secreção de melanina de R265, *cnbg4278Δ-P_{H3}CNMG4278 19, 38 e 62*. Os resultados foram analisados por Two-Way ANOVA

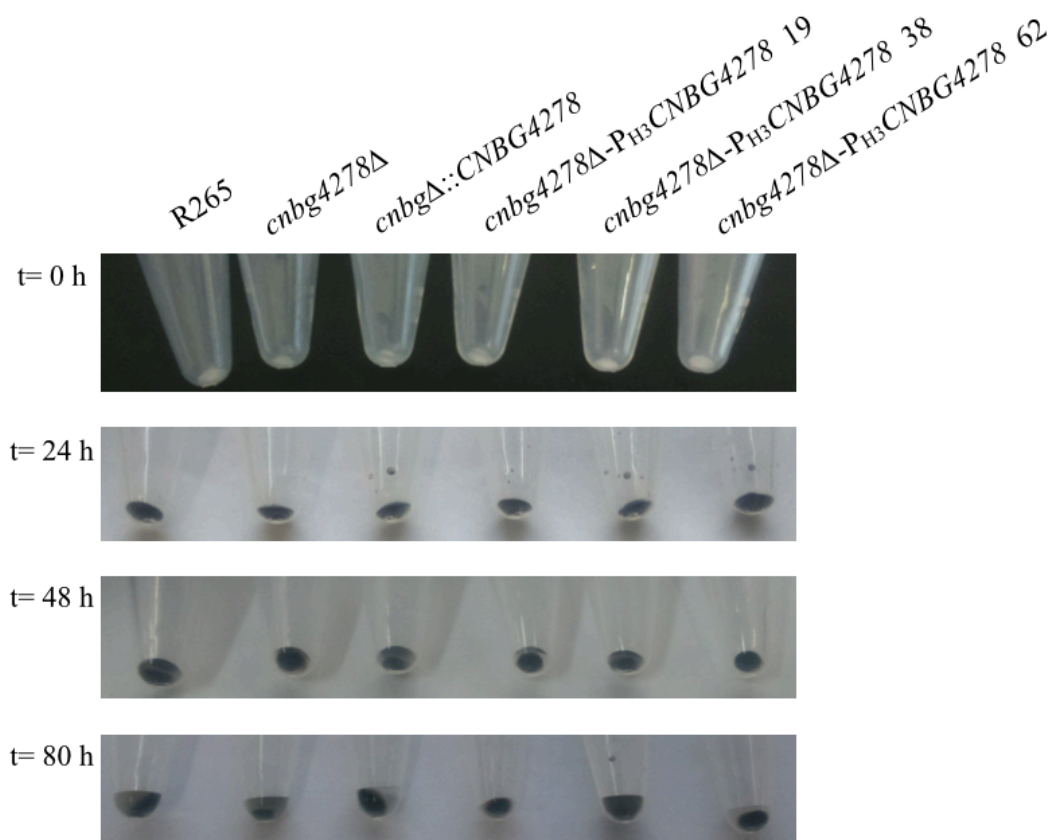


Figura 13. Pigmentação celular após indução de síntese de melanina. Após 0, 24, 48 e 80 h de indução, as células foram centrifugadas e fotografadas para análise visual.

5.3.5 Produção de cápsula

A fim de avaliar a capacidade das linhagens de produzirem cápsula, foi realizada uma indução em meio DMEM e atmosfera de 5% CO₂. Após 48 h de indução, as células foram fixadas em paraformaldeído 4 % e coradas com tinta nanquim para visualização em microscópio óptico (Figura 14). Cinquenta células de cada amostra foram medidas e os resultados demonstraram que todas as células foram capazes de induzir cápsula polissacarídica. Foi verificada diferença estatística apenas para o mutante de superexpressão 62 em relação a R265. Os dados foram analisados por *One-Way* ANOVA e teste T, usando como referência os valores de R265 (Figura 15).

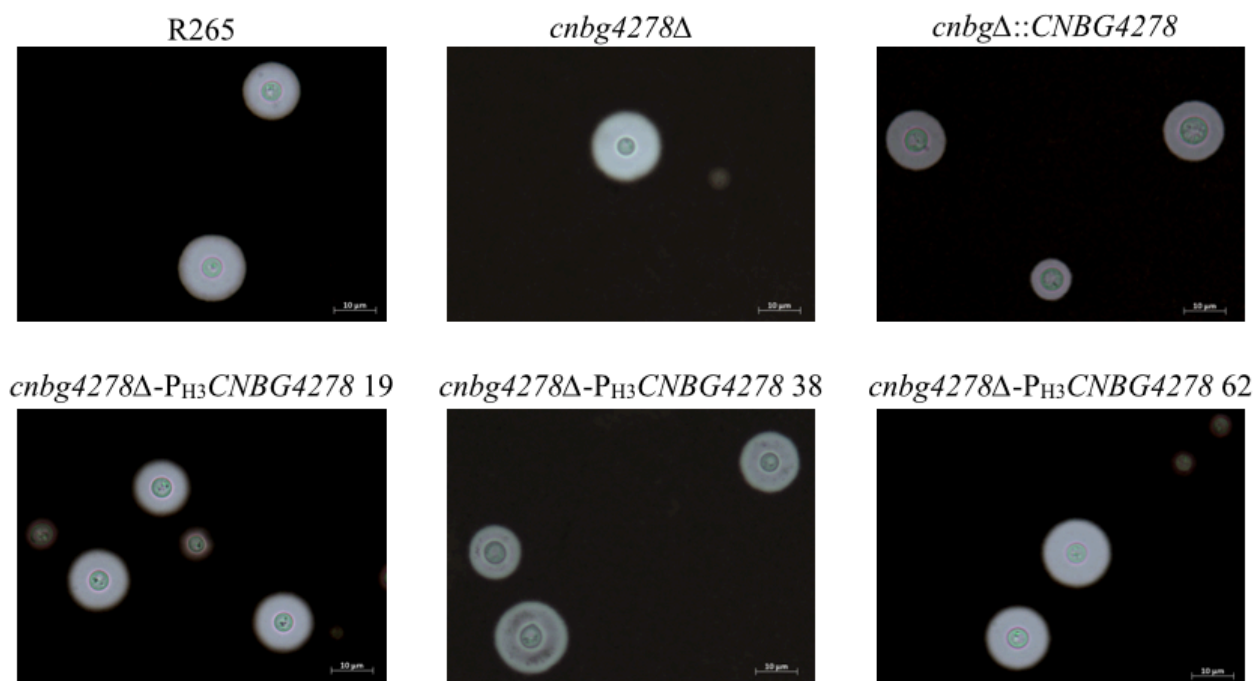


Figura 14. Indução de cápsula das linhagens R265 e mutantes de CNBG4278. A indução foi realizada em meio DMEM a 37 °C e 5 % de CO₂ por 48 h.

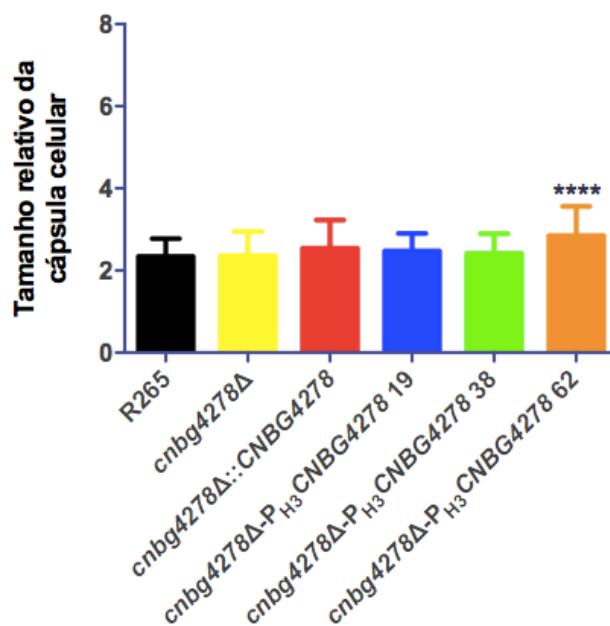


Figura 15. Tamanho relativo da cápsula celular após indução de 48h. Os dados foram analisados por One-Way ANOVA. Asteriscos indicam diferença significativa em relação aos valores de R265. Asteriscos indicam $p < 0.0001$.

5.3.6 Atividade de fosfolipase

A análise da capacidade de produção de fosfolipase pelas linhagens estudadas foi realizada em meio acrescido de uma emulsão de gema de ovo na concentração de 8 %. Após 48 h de incubação, foi possível observar o início da formação de um halo opaco ao redor das colônias de todas as linhagens testadas. Após 96 h, verificamos a atividade enzimática da fosfolipase (Pz), a qual é medida através da razão entre o diâmetro da colônia (DC) e o diâmetro da colônia e sua zona de precipitação (DCP). Se $Pz = 1$, a atividade é considerada negativa; $1 > Pz > 0,64$ a atividade é positiva; e $Pz < 0,64$ a atividade é fortemente positiva. Os resultados demonstraram que todas as linhagens apresentam atividade altamente positiva de fosfolipase, não havendo diferença estatística entre os valores de Pz quando os dados foram analisados por *One-Way* ANOVA (Tabela 2). Além disso, nenhuma diferença visual pôde ser observada entre as linhagens durante o experimento (Figura 16)

Tabela 2. Análise da atividade enzimática de fosfolipase nas linhagens R265, *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278*, *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62.

Linhagem	DC	DCP	Pz	Atividade Enzimática
R265	3,51 cm	7,42 cm	0,47	Fortemente Positiva
<i>cnbg4278Δ</i>	3,50 cm	7,03 cm	0,50	Fortemente Positiva
<i>cnbg4278Δ::CNBG4278</i>	3,31 cm	6,53 cm	0,51	Fortemente Positiva
<i>cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278</i> 19	3,43 cm	6,50 cm	0,53	Fortemente Positiva
<i>cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278</i> 38	3,10 cm	6,60 cm	0,47	Fortemente Positiva
<i>cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278</i> 62	3,13 cm	6,17 cm	0,51	Fortemente Positiva

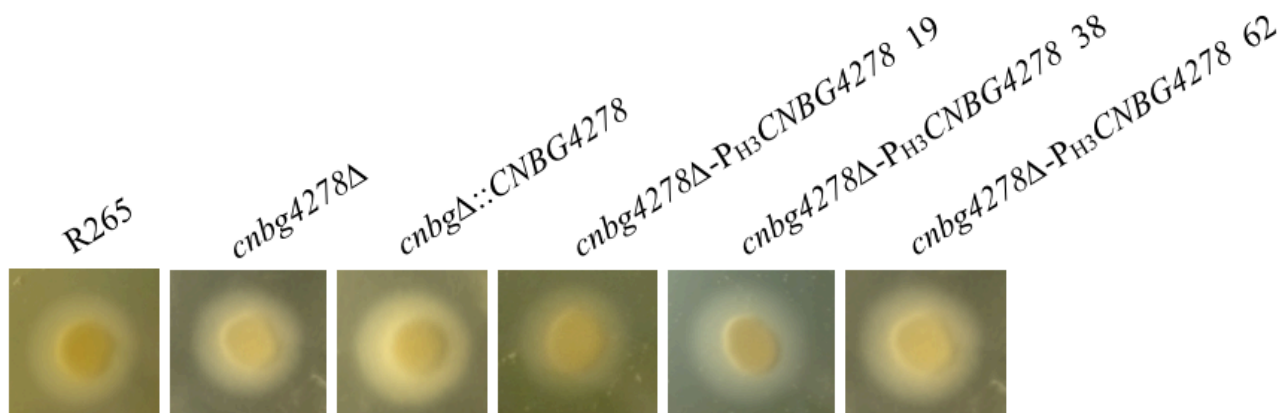


Figura 16. Avaliação da atividade de fosfolipase. As linhagens testadas produziram halo opaco ao redor da colônia, demonstrando capacidade de produzir fosfolipase. Os valores de Pz indicam que a atividade enzimática de fosfolipase é altamente positiva em todas as linhagens testadas.

5.3.7 Atividade de urease

Neste ensaio as linhagens de *C. neoformans* H99, *C. gattii* R265 e *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ::CNBG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19, 38 e 62 foram submetidas a um teste colorimétrico para avaliação da atividade de urease. Após 6 h de incubação a OD_(560nm) foi medida e, para valores de OD>0.3, a atividade foi considerada positiva. Não foi possível detectar atividade positiva para qualquer linhagem de *C. gattii*, apenas para a linhagem de *C. neoformans* H99, utilizada como controle positivo (Figura 17).

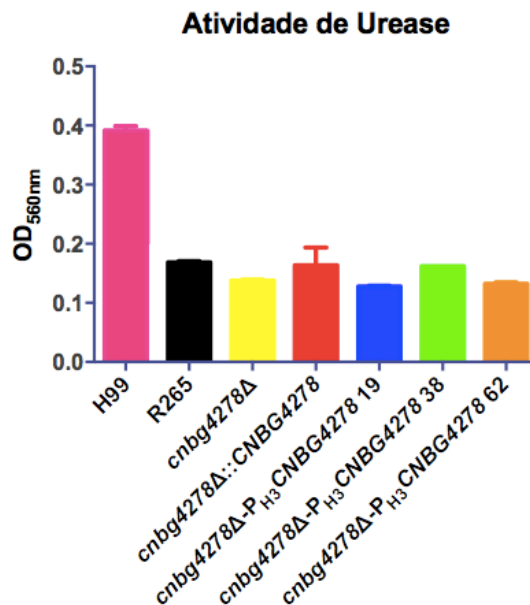
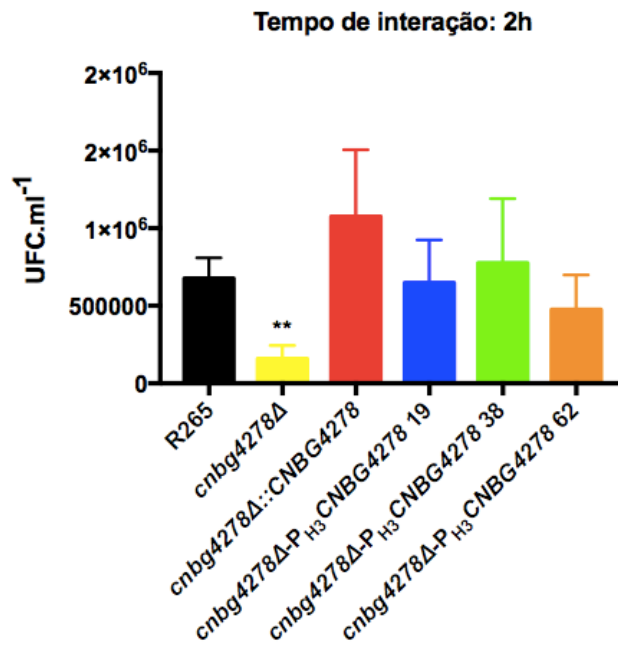


Figura 17. Ensaio de avaliação da atividade de urease. Os valores foram analisados por *One-Way* ANOVA. Apenas a linhagem de *C. neoformans* H99 apresentou atividade considerada positiva (OD>0.3).

5.4 Fagocitose em macrófagos murinos J774.A1

As linhagens em estudo foram submetidas à fagocitose por macrófagos J774.A1. Após 2 h e 24 h de interação, os macrófagos foram lisados e os fungos internalizados foram recuperados e plaqueados para posterior contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os resultados obtidos demonstram uma menor taxa de fagocitose de *cnbg4278Δ* após 2 h de interação (Figura 18A). Após 24 h não há diferença estatística entre as linhagens (Figura 18B).

(A)



(B)

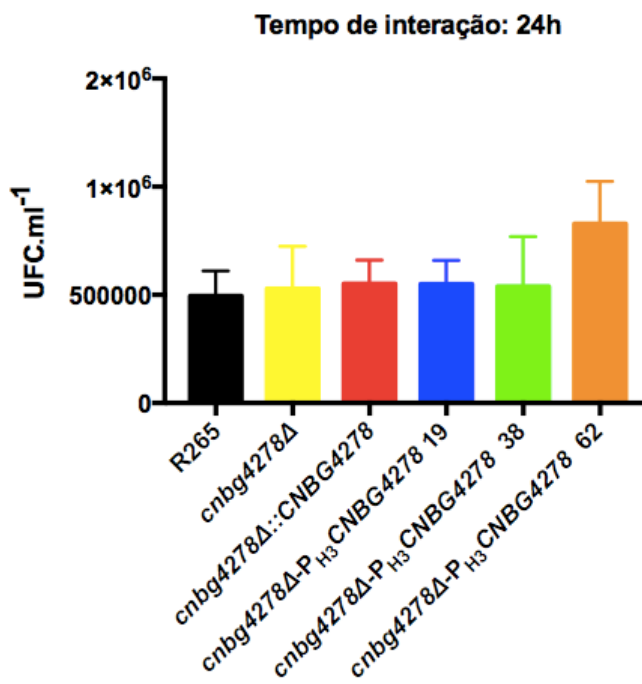


Figura 18. Ensaio de sobrevivência em macrófagos J774.A1 das linhagens R265 e mutantes para o gene CNBG4278. (A) UFC após 2 h de interação. (B) UFC após 24 h de interação. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental. Os resultados foram estatisticamente avaliados por teste T. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significantes em relação aos valores de R265 ($p < 0.05$).

6. DISCUSSÃO

Cerca de 95% dos casos de criptococose ocorrem devido à infecção por *C. neoformans* (Lin 2009). O Rio Grande do Sul é o segundo Estado do Brasil com maior incidência de casos de infecção pelas leveduras patogênicas do gênero *Cryptococcus*, principalmente devido ao alto número de pacientes também infectados pelo vírus HIV (SES-CEVS-TABNET). A minoria dos casos de criptococose são derivados da infecção por *C. gattii*. No entanto, há uma clara preferência deste patógeno por infectar pacientes imunocompetentes.

A resposta imune mediada por células T é essencial para a defesa do hospedeiro durante o desenvolvimento da criptococose (Voelz & May 2010). As manoproteínas compõe cerca de 1% da cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* sp. e já demonstraram ser capazes de induzir este tipo de resposta (Levitz e Specht, 2006). Portanto, estas moléculas, devido à alta imunogenicidade e possível envolvimento no processo de infecção, têm sido consideradas promissoras para o desenvolvimento de vacinas ou imunoterapias contra a criptococose.

O gene CNBG4278 codifica uma manoproteína hipotética em *C. gattii*. Diversas manoproteínas de *C. neoformans* já demonstraram ação altamente imunogênica, além de envolvimento no processo de infecção (Cadieux et al. 2013; Teixeira et al. 2014). Apesar de serem moléculas promissoras, ainda não existe nenhum relato na literatura da caracterização de manoproteínas provenientes de *C. gattii*. Este fato, aliado à expressão diferenciada de CNBG4278 em situações de interação com o hospedeiro, sugerem que este gene pode ser um interessante alvo de estudo. Dessa forma, neste trabalho realizamos a construção de mutantes de superexpressão do gene CNBG4278 de *C. gattii* e a realização de testes fenotípicos com os mutantes construídos em conjunto com os mutantes nulo e complementado do mesmo gene, a fim de identificar possíveis funções de CNBG4278.

A deleção do gene CNBG4278 resultou no mutante *cnbg4278Δ*, o qual apresenta um fenótipo mucoide, característica que foi revertida no mutante complementado *cnbg4278Δ::CNBG4278*. Durante a construção dos mutantes de superexpressão, 6 linhagens transformadas tiveram seus níveis de mRNA do gene de interesse quantificados. A partir destes resultados selecionamos os 3 transformantes que apresentavam maiores níveis relativos do transcrito de CNBG4278 para dar continuidade aos experimentos. Dos 3 transformantes selecionados, apenas um deles (*cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 38) mostrou uma reversão do fenótipo mucoide observado em *cnbg4278Δ*. No entanto, apesar desta observação, decidimos manter a análise de *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19 e 62 para a avaliação de possíveis diferenças fenotípicas.

Para a confirmação de todos os mutantes construídos, realizamos as técnicas de RT-PCR e *Real Time* RT-qPCR. Os resultados confirmaram que os mutantes *cnbg4278Δ-P_{H3}CNKG4278* 19, 38 e 62 possuem o gene de interesse e são capazes de realizar sua transcrição em níveis estatisticamente mais elevados do que *C. gattii* R265 (Figura 7;Figura 8).

Realizamos diferentes testes fenotípicos com a finalidade de avaliar a existência de possíveis alterações nos principais fatores de virulência de *Cryptococcus* sp. Os resultados demonstraram que não há diferença na taxa de crescimento das leveduras a 37 °C (Figura 9) ou na presença de estressores osmóticos (Figura 10). Portanto, CNKG4278 não interfere na termotolerância ou na resistência de *C. gattii* a condições de estresse osmótico.

Nos experimentos realizados com estressores de parede celular foi observado um fenótipo diferenciado entre os transformantes. As linhagens *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ-P_{H3}CNKG4278* 19 e 62, as quais apresentam colônia com fenótipo mucoide, são hipersensíveis a *Congo Red* na concentração de 5 mg/mL; enquanto as linhagens R265, *cnbg4278Δ::CNKG4278* e *cnbg4278Δ-P_{H3}CNKG4278* 38, cujas colônias revertem o fenótipo mucoide de *cnbg4278Δ*, são capazes de crescer no meio, apresentando colônias escurecidas nas diluições 10⁷ e 10⁶ células/mL (Figura 11). *Congo Red* e *CalcoFluor White* são corantes que interagem com as cadeias de glucanas e quitinas, bloqueando as enzimas que conectam estas cadeias no processo de montagem da parede celular de fungos. A suscetibilidade aumentada a estes compostos está relacionada a defeitos na parede celular de diferentes fungos, incluindo *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. neoformans* entre outros (Ram & Klis 2006). Sendo assim, estes resultados indicam que existe algum dano na parede celular das linhagens *cnbg4278Δ*, *cnbg4278Δ-P_{H3}CNKG4278* 19 e 62, o qual não deve influenciar tão fortemente sua estabilidade, já que não houve diferença fenotípica entre os transformantes quando incubados na presença de SDS (0,005%), *Calcofluor White* (300 µg/mL) ou *Congo Red* em menor concentração (400 µg/mL). O fenótipo escurecido apresentado pelas demais colônias em *Congo Red* (5 mg/mL) provavelmente é decorrente da associação entre *Congo Red* e β-glucanas, as quais estão presentes em maior concentração nas diluições de 10⁷ e 10⁶ células/mL.

A produção de melanina é um mecanismo de defesa da levedura que permite sua sobrevivência em condições desfavoráveis, protegendo as leveduras de agentes oxidantes e luz ultravioleta, por exemplo (Eisenman & Casadevall 2012). O teste de melanização realizado em meio mínimo contendo L-DOPA (condição sem estressores de parede celular) demonstrou que todas as linhagens são capazes de produzir melanina, mas o padrão de produção do composto difere de R265 para todos os transformantes (Figura 12).

A capacidade de formação de cápsula das linhagens também foi avaliada. Observou-se diferença estatística apenas para o transformante *cnbg4278Δ-P_{H3}CNKG4278* 62 (Figura 14).

Portanto, a deleção de CNBG4278 não interfere na capacidade da levedura de formar cápsula polissacarídica. Em relação à enzima fosfolipase, CNBG4278 não interfere em sua produção. Todas as linhagens testadas apresentaram forte atividade enzimática, não havendo diferença estatística entre elas (Figura 16).

O resultado obtido para o teste da atividade de urease demonstrou que nenhuma linhagem de *C. gattii* apresenta atividade considerada positiva de urease ($OD_{592nm} > 0.3$) (Figura 17). *C. neoformans* H99 foi a única linhagem com atividade considerada positiva neste ensaio. A atividade da urease é um fator de virulência que facilita a transmigração das leveduras ao SNC (Osterholzer et al. 2009; Feder et al. 2015). Considerando que *C. gattii* tende a causar infecções mais restritas à região pulmonar justamente por apresentar menor capacidade de transmigração para o SNC, o resultado esperado seria uma menor atividade de urease para as linhagens de *C. gattii* quando comparadas a *C. neoformans* H99. Entretanto, os resultados do teste não mostraram apenas menores níveis, mas a ausência da atividade de urease. Sendo assim, testes mais sensíveis serão realizados para confirmar este fator.

Após serem fagocitadas por macrófagos, as leveduras do gênero *Cryptococcus* são capazes de se replicar dentro do fagossomo (Voelz et al. 2009), sendo este o ambiente ideal para as leveduras evitarem seu reconhecimento por células do sistema imune do hospedeiro (Johnston & May 2013; Leopold Wager et al. 2016). Em geral, as linhagens que mais se proliferam em macrófagos apresentam menor cápsula polissacarídica, maior atividade de lacase e são mais resistentes a tratamentos antifúngicos, o que demonstra a importância desta interação nas manifestações clínicas (Sabiiti et al. 2014; Leopold Wager et al. 2016). Portanto, para testarmos a virulência *in vitro* das linhagens estudadas, realizamos um teste de sobrevivência em macrófagos J774.A1 (Figura 18). O resultado demonstrou que as leveduras *cnbg4278Δ* foram menos fagocitadas em um tempo curto de interação, mas seu nível de fagocitose foi igualado ao de R265 após 24 horas de interação, indicando que a modulação sobre os macrófagos é efetuada nas primeiras horas. Os mutantes de superexpressão apresentaram resultados similares aos da linhagem selvagem R265. Para avaliarmos o índice de replicação das linhagens dentro dos macrófagos, é necessário realizar a interação em condições diferentes das utilizadas nesse estudo.

Apesar dos níveis relativos de CNBG4278 serem bastante elevados nas linhagens de superexpressão (Figura 6), isso pode não representar os níveis reais de expressão do gene, já que o mRNA produzido pode ser degradado antes do início de sua tradução (Haimovich et al. 2013). Além disso, o método de transformação biobalística promove uma inserção aleatória do fragmento de interesse ao genoma da levedura. Considerando que regiões codificadoras compõem cerca de 85% do genoma de *C. neoformans*, por exemplo, é possível que o gene de interesse seja inserido dentro destas regiões, podendo alterar a expressão de outros genes e gerar fenótipos

irregulares (Arras et al. 2015). Os níveis de expressão do gene de interesse também podem ser alterados pela ação de elementos moduladores da expressão gênica e também pelo nível de compactação da cromatina da região em que o gene foi inserido. Quando inserido em regiões mais relaxadas da cromatina ou perto de *enhancers*, a expressão do gene pode ser intensificada. Por outro lado, a transcrição gênica pode ser atenuada devido à ação de elementos isoladores ou à inserção do gene em regiões de cromatina mais compactada, dificultando o acesso da maquinaria de transcrição celular. Além disso, através do método de biobalística o vetor pode ser inserido no genoma em um número de cópias variável. Sendo assim, os resultados obtidos até o momento contribuem para a determinação da função de CNBG4278. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para sua completa caracterização. O que pode ser afirmado é que a deleção de CNBG4278 causou diferenças fenotípicas na levedura em relação à linhagem selvagem, as quais não foram revertidas nas linhagens *cnbg4278Δ-P_{H3}CNBG4278* 19 e 62.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliação da replicação intracelular das linhagens mutantes em macrófagos J774.A1;
- Quantificação da secreção de GXM ao sobrenadante de cultivo das linhagens mutantes para o gene CNBG4278;
- Avaliação da composição e da estrutura da cápsula polissacarídica das linhagens mutantes por cromatografia de troca iônica e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente;
- Determinação do número de cópias do vetor pJAF1_CNBG4278 inseridas ao genoma das linhagens de superexpressão por Real Time RT-qPCR;
- Ensaios de virulência em modelo murino de criptococose.

8. REFERÊNCIAS

- Angkasekwinai, P. et al., 2014. Cryptococcus gattii infection dampens Th1 and Th17 responses by attenuating dendritic cell function and pulmonary chemokine expression in the immunocompetent hosts. *Infection and Immunity*, 82(9), pp.3880–3890.
- Anna Vecchiarelli, Eva Pericolini, Elena Gabrielli, Samyr Kenno, Stefano Perito, E.C.& C.M., 2013. Elucidating the immunological function of the Cryptococcus neoformans capsule. *Future Microbiol*, 8(9), pp.1107–1116.
- Antachopoulos, C. & Walsh, T.J., 2012. Immunotherapy of Cryptococcus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(2), pp.126–133.
- Arora, S. et al., 2011. Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with Cryptococcus neoformans. *Infection and Immunity*, 79(5), pp.1915–1926.
- Arras, S.D.M. et al., 2015. A genomic safe haven for mutant complementation in cryptococcus neoformans. *PLoS ONE*, 10(4).
- Bahn, Y.S., 2014. Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(7), p.a019760.
- Baker, L.G. et al., 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in Cryptococcus neoformans. *Eukaryotic Cell*, 6(5), pp.855–867.
- Bielska, E. & May, R.C., 2016. What makes *Cryptococcus gattii* a pathogen? *FEMS Yeast Research*, 16(1), p.fov106. Available at: <http://femsyr.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femsyr/fov106>.
- Blanco, J.L. & Garcia, M.E., 2008. Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 125(1-2), pp.47–70.
- Bratton, E.W. et al., 2012. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and hiv-negative/non-transplant. *PLoS ONE*, 7(8).
- Byrnes Edmond J., I.J. et al., 2011. A diverse population of Cryptococcus gattii molecular type VGIII in Southern Californian HIV/AIDS patients. *PLoS Pathogens*, 7(9).
- Byrnes, E.J. et al., 2010. Emergence and pathogenicity of highly virulent Cryptococcus gattii genotypes in the northwest United States. *PLoS pathogens*, 6(4), p.e1000850.
- Cadieux, B. et al., 2013. The Mannoprotein Cig1 Supports Iron Acquisition From Heme and Virulence in the Pathogenic Fungus Cryptococcus neoformans. , 207, pp.1339–1347.

- Cao, L. et al., 1998. MP1 encodes an abundant and highly antigenic cell wall mannoprotein in the pathogenic fungus *Penicillium marneffei*. *Infection and Immunity*, 66(3), pp.966–973.
- Carbó, N. & Pérez-Martín, J., 2010. Activation of the cell wall integrity pathway promotes escape from G2 in the Fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Genetics*, 6(7), pp.1–18.
- Chang, Y.C. et al., 2004. Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infection and Immunity*, 72(9), pp.4985–4995.
- Charlier, C. et al., 2005. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *The American journal of pathology*, 166(2), pp.421–432.
- Chayakulkeeree, M. et al., 2008. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 69(4), pp.809–826.
- Chen, Y.-L. et al., 2013. Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(3), pp.527–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3583459&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cheng, P.Y., Sham, A. & Kronstad, J.W., 2009. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(10), pp.4284–4294.
- Chong, K.T.K. et al., 2004. AFMP2 Encodes a Novel Immunogenic Protein of the Antigenic Mannoprotein Superfamily in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5), pp.2287–2291.
- Coelho, C., Bocca, A.L. & Casadevall, A., 2014. The Tools for Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Advances in Applied Microbiology*, 87, pp.1–41.
- Cogliati, M., 2013. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. *Scientifica*, 2013(serotype D), p.675213. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cox, G.M. et al., 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39(1), pp.166–175.
- Cox, G.M. et al., 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infection and Immunity*, 68(2), pp.443–448.

- da Cunha Colombo, E.R., Mora, D.J. & Silva-Vergara, M.L., 2011. Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) associated with *Cryptococcus neoformans* infection in AIDS patients. *Mycoses*, 54(4), pp.e178–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20337940>.
- Djordjevic, J.T., 2010. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 1(NOV).
- Djordjevic, J.T. et al., 2005. Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor. *The Biochemical journal*, 389, pp.803–812.
- Donlin, M. et al., 2014. Cross Talk between the Cell Wall Integrity and Cyclic AMP/Protein Kinase A Pathways in *Cryptococcus neoformans*. *mBio*, 5(4), pp.1–10. Available at: <http://mbio.asm.org/content/5/4/e01573-14.short>.
- Eisenman, H.C. & Casadevall, A., 2012. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), pp.931–940.
- Ellerbroek, P.M. et al., 2004. Effects of the capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* on phagocyte migration and inflammatory mediators. *Current medicinal chemistry*, 11(2), pp.253–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14754421>.
- Fang, W., Fa, Z. & Liao, W., 2015. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China. *Fungal Genetics and Biology*, 78, pp.7–15.
- Feder, V. et al., 2015. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *FEBS Journal*, 282(8), pp.1406–1418.
- Feldmesser, M., Kress, Y. & Casadevall, a, 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology (Reading, England)*, 147, pp.2355–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11496012>.
- Franzot, S.P., Salkin, I.F. & Casadevall, A., 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), pp.838–840.
- Fraser, J.A. et al., 2003. Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: Implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada. *Eukaryotic Cell*, 2(5), pp.1036–1045.
- Frieman, M.B., McCaffery, J.M. & Cormack, B.P., 2002. Modular domain structure in the *Candida glabrata* adhesin Epa1p, a α 1,6 glucan-cross-linked cell wall protein. *Molecular Microbiology*, 46(2), pp.479–492.
- Ganendren, R. et al., 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes and Infection*, 8(4), pp.1006–1015.

- Geddes, J.M.H. et al., 2015. Secretome profiling of *Cryptococcus neoformans* reveals regulation of a subset of virulence-associated proteins and potential biomarkers by protein kinase A. *BMC Microbiology*, 15(1), p.206. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/206>.
- Ghannoum, M.A., 2000. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), pp.122–143.
- Gibson, J.F. & Johnston, S.A., 2014. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*.
- Gibson, J.F. & Johnston, S.A., 2015. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. *Fungal Genetics and Biology*, 78, pp.76–86.
- Grijpstra, J., 2008. *Capsule Biogenesis in Cryptococcus Neoformans*, Available at: <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2008-1215-200936/grijpstra.pdf>.
- Gullo, F.P. et al., 2013. Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(11), pp.1377–1391.
- Hagen, F. et al., 2013. Ancient Dispersal of the Human Fungal Pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon Rainforest. *PLoS ONE*, 8(8).
- Hagen, F. & Boekhout, T., 2010. The Search for the Natural Habitat of *Cryptococcus gattii*. *Mycopathologia*, 170(4), pp.209–211.
- Haimovich, G. et al., 2013. Gene expression is circular: Factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*, 153(5).
- Harris, J.R. et al., 2013. *Cryptococcus gattii* infections in multiple states outside the US Pacific Northwest. *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), pp.1620–1626.
- Huang, C. et al., 2002. Purification and characterization of a second immunoreactive mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* that stimulates T-cell responses. *Infection and Immunity*, 70(10), pp.5485–5493.
- Huffnagle, G.B., Yates, J.L. & Lipscomb, M.F., 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 173(April), pp.793–800.
- Idnurm and Lin, 2015. Rising to the challenge of multiple *Cryptococcus* species and the diseases they cause. *Fungal Genet Biol.*, 78(12), pp.1–6.
- Jarvis, J.N. et al., 2013. The phenotype of the cryptococcus-specific CD4⁺ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, 207(12), pp.1817–1828.

- Jesus, M. De et al., 2010. Glucuronoxylomannan, galactoxylomannan, and mannoprotein occupy spatially separate and discrete regions in the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*, 1(6), pp.500–508.
- Johnston, S.A. & May, R.C., 2013. *Cryptococcus* interactions with macrophages: Evasion and manipulation of the phagosome by a fungal pathogen. *Cellular Microbiology*, 15(3), pp.403–411.
- Kidd, S.E. et al., 2004. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), pp.17258–17263.
- Kmetzsch, L. et al., 2011. Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence. *Molecular Microbiology*, 81(1), pp.206–218.
- Kopecká, M. & Gabriel, M., 1992. The influence of Congo red on the cell wall and (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 158(2), pp.115–126. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00245214>.
- Korn, T. et al., 2007. Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in Immunology*, 19(6), pp.362–371.
- Kraus, P.R., Nichols, C.B. & Heitman, J., 2005. Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth. *Eukaryotic Cell*, 4(6), pp.1079–1087.
- Kwon-Chung, K.J. et al., 1987. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 55(8), pp.1751–1754.
- Kwon-Chung, K.J. & Bennett, J.E., 1984. High prevalence of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in tropical and subtropical regions. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology*, 257(2), pp.213–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6207684>.
- Kwon-Chung, K.J. & Varma, A., 2006. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6(4), pp.574–587.
- Lam, J.S. et al., 2005. A model vaccine exploiting fungal mannosylation to increase antigen immunogenicity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(11), pp.7496–7503.
- Leopold Wager, C.M. et al., 2016. *Cryptococcus* and Phagocytes: Complex Interactions that Influence Disease Outcome. *Frontiers in microbiology*, 7, p.105. Available at: [/pmc/articles/PMC4746234/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC4746234/?report=abstract).

- Levitz, S.M. et al., 2001. Molecular characterization of a mannoprotein with homology to chitin deacetylases that stimulates T cell responses to *Cryptococcus neoformans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), pp.10422–10427. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=56976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Levitz, S.M. & Specht, C.A., 2006. The molecular basis for the immunogenicity of *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *FEMS Yeast Research*, 6(4), pp.513–524.
- Lin, X., 2009. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), pp.401–416.
- Lin, X. & Heitman, J., 2006. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annu.Rev.Microbiol.*, 60(0066-4227 (Print)), pp.69–105. Available at: C:\KARSTEN\PDFs\Mykologie-PDFs\Myk-2006\Lin - Heitman-The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex.pdf.
- Lindell, D.M. et al., 2005. Generation of antifungal effector CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection. *J Immunol*, 174(12), pp.7920–7928. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15944298> <http://www.jimmunol.org/content/174/12/7920.full.pdf>.
- Liu, T., Perlin, D.S. & Xue, C., 2012. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. *Virulence*, 3(April), pp.173–181.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp.402–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>.
- Lupo, P. et al., 2008. The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus. *Infection and Immunity*, 76(4), pp.1581–1589.
- Ma, H. & May, R.C., 2009. Chapter 5 Virulence in *Cryptococcus* Species. *Advances in Applied Microbiology*, 67(C), pp.131–190.
- MacDougall, L. et al., 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), pp.42–50.
- Mansour, M.K., Schlesinger, L.S. & Levitz, S.M., 2002. Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans* mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(6), pp.2872–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11884457>.

- Martínez, J.P. et al., 1998. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), pp.121–141.
- McQuiston, T.J. & Williamson, P.R., 2012. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 18(1), pp.1–9.
- Miyagi, K. et al., 2005. CpG oligodeoxynucleotides promote the host protective response against infection with *Cryptococcus neoformans* through induction of interferon-gamma production by CD4+ T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(2), pp.220–229.
- Muller, U. et al., 2007. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, 179(8), pp.5367–5377.
- Murdock, B.J. et al., 2014. Early or late IL-10 blockade enhances Th1 and Th17 effector responses and promotes fungal clearance in mice with cryptococcal lung infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(8), pp.4107–16. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4193595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ngamskulrungraj, P. et al., 2012. The Primary Target Organ of *Cryptococcus gattii* Is Different from That of *Cryptococcus neoformans* in a Murine Model. , 3(3), pp.1–9.
- Nielsen, K., De Obaldia, A.L. & Heitman, J., 2007. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: Implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryotic Cell*, 6(6), pp.949–959.
- Nosanchuk, J.D. & Casadevall, A., 2006. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), pp.3519–3528.
- Olivares, L.R.C. et al., 2009. Genotyping of Mexican *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* isolates by PCR-fingerprinting. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 47(7), pp.713–721.
- de Oliveira Schneider, R. et al., 2012. Zap1 regulates zinc homeostasis and modulates virulence in *Cryptococcus gattii*. *PLoS ONE*, 7(8).
- Olszewski, M. a et al., 2004. Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American journal of pathology*, 164(5), pp.1761–1771.
- Osterholzer, J.J. et al., 2009. Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung. *The American journal of pathology*, 174(3), pp.932–943.

- Pappas, P.G. & Birmingham, F., 2013. Cryptococcal Infections in Non-Hiv-Infected Patients. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 124, pp.61–79.
- Park, B.J. et al., 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), pp.525–530. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182676>.
- Peres da Silva, R. et al., 2015. Extracellular vesicle-mediated export of fungal RNA. *Scientific reports*, 5, p.7763. Available at: <http://www.nature.com/srep/2015/150114/srep07763/full/srep07763.html>.
- Perfect, J.R. & Bicanic, T., 2015. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genetics and Biology*, 78, pp.49–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.003>.
- Pietrella, D. et al., 2002. Mannoprotein from *Cryptococcus neoformans* promotes T-helper type 1 anticandidal responses in mice. *Infection and Immunity*, 70(12), pp.6621–6627.
- Pietrella, D. et al., 2001. Role of mannoprotein in induction and regulation of immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 69(5), pp.2808–2814.
- Pitzurra, L. et al., 2000. Early induction of interleukin-12 by human monocytes exposed to *Cryptococcus neoformans* mannoproteins. *Infection and Immunity*, 68(2), pp.558–563.
- Prado, M. et al., 2009. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: A review from 1996 to 2006. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(3), pp.513–521.
- Price, M.F., Wilkinson, I.D. & Gentry, L.O., 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20(1), pp.7–14.
- Ram, A.F.J. & Klis, F.M., 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature protocols*, 1(5), pp.2253–2256.
- Rodrigues, M.L. et al., 2008. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), pp.58–67.
- Roncero, C. & Duran, A., 1985. Effect of Calcofluor White and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology*, 163(3), pp.1180–1185.
- Sabiiti, W. et al., 2014. Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), pp.2000–2008.
- Sabiiti, W. & May, R.C., 2012. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future Microbiol*, 7(11), pp.1297–1313. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23075448>
<http://media.proquest.com/media/pq/classic/doc/2791643581/fmt/pi/rep/NONE?hl=&cit:auth=Sabiiti,+Wilber;May,+Robin+C&cit:titl>

- e=Mechanisms+of+infection+by+the+human+fungal+pathogen+Cryptococcus+neoforman.
- Salas, S.D. et al., 1996. Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of experimental medicine*, 184(August), pp.377–386.
- Shoham, S. & Levitz, S.M., 2005. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*, 129(5), pp.569–582.
- Siegemund, S. & Alber, G., 2008. *Cryptococcus neoformans* activates bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than plasmacytoid dendritic cells and down-regulates macrophages. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(3), pp.417–427.
- Sifuentes-Osornio, J., Corzo-Le??n, D.E. & Ponce-De-Le??n, L.A., 2012. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*, 6(1), pp.23–34.
- Sorrell, T.C. et al., 2016. Cryptococcal transmigration across a model brain blood-barrier: Evidence of the Trojan horse mechanism and differences between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* strain H99 and *Cryptococcus gattii* strain R265. *Microbes and Infection*, 18(1), pp.57–67.
- Specht, C. a et al., 2007. Contribution of glycosylation to T cell responses stimulated by recombinant *Cryptococcus neoformans* mannoprotein. *The Journal of infectious diseases*, 196, pp.796–800.
- Stenzel, W. et al., 2009. IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis. *The American journal of pathology*, 174(2), pp.486–496.
- Teixeira, P.A.C. et al., 2014. Mannoprotein MP84 mediates the adhesion of *Cryptococcus neoformans* to epithelial lung cells. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4(August), p.106. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4137752&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Toffaletti, D.L. et al., 1993. Gene transfer in *Cryptococcus neoformans* by use of biolistic delivery of DNA. *Journal of Bacteriology*, 175(5), pp.1405–1411.
- Ueno, K. et al., 2015. Dendritic cell-based immunization ameliorates pulmonary infection with highly virulent *Cryptococcus gattii*. *Infection and Immunity*, 83(4), pp.1577–1586.
- Urai, M. et al., 2015. Evasion of Innate Immune Responses by the Highly Virulent *Cryptococcus gattii* by Altering Capsule Glucuronoxylomannan Structure. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5(January), p.101. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4701946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Velagapudi, R. et al., 2009. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(10), pp.4345–4355.
- Veltman, J.A., Bristow, C.C. & Klausner, J.D., 2014. Meningitis in HIV-positive patients in sub-Saharan Africa: A review. *Journal of the International AIDS Society*, 17.
- Villena, S.N. et al., 2008. Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand. *Cellular Microbiology*, 10(6), pp.1274–1285.
- Voelz, K., Lammas, D.A. & May, R.C., 2009. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 77(8), pp.3450–3457.
- Voelz, K. & May, R.C., 2010. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryotic Cell*, 9(6), pp.835–846.
- Yu, J.H. et al., 2004. Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), pp.973–981.
- Zhang, Y. et al., 2009. Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99. *Am J Pathol*, 175(6), pp.2489–2500.